Untersuchungen zur Multiplizität von Transfer-Ribonucleinsäuren und zur Erkennungsregion für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Klaus Harbers

1971

Untersuchungen zur Multiplizität von Transfer-Ribonucleinsäuren und zur Erkennungsregion für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

---

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Klaus Harbers

aus Delmenhorst

München 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1971

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit von Februar 1968 bis September 1971 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. G. Zachau danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. Rainer Thiebe sage ich herzlichen Dank für stetige Anregung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Den anderen Kollegen der Abteilung danke ich für anregende Diskussionen. Herrn Dr. F. Sauer danke ich für die Elektronenmikroskopaufnahmen.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

H. Overath, F. Fittler, K. Harbers, R. Thiebe und H.G. Zachau, FEBS-Letters 11, 289 (1970)

K. Harbers, R. Thiebe und H.G. Zachau, eingereicht zur Veröffentlichung.

R. Thiebe, K. Harbers und H.G. Zachau, eingereicht zur Veröffentlichung.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung und Problemstellung 1

II. Serinspezifische tRNAs aus Hefe-Mitochondrien 5

1. Einleitung 5

2. Isolierung der Mitochondrien aus Hefe und Extraktion der mitochondrialen tRNA 7

3. Vergleich der Akzeptoraktivität von tRNA aus ganzen Zellen und aus Mitochondrien 11

4. Enzymatische Hydrolyse der Seryl-tRNAs aus ganzen Zellen und aus Mitochondrien mit T1-RNase und chromatographischer Vergleich der Seryl-tRNAs 12

5. Vergleich von mitochondrialer tRNA und Gesamt-tRNA durch Chromatographie der Seryl-tRNAs an benzoylierter DEAE-Cellulose 13

6. Vergleich der tRNA aus einer petite-Mutante ohne mitochondriale DNA mit der tRNA aus dem Wildtyp des gleichen Hefestammes durch Chromatographie der Seryl-tRNAs an benzoylierter DEAE-Cellulose 17

7. Diskussion 17

III. Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen $tRNA^{Phe}$ und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe mit Hilfe von Fragmenten aus $tRNA^{Phe}$ 20

1. Einleitung 20

2. Darstellung von Fragmenten aus $tRNA^{Phe}$ 21

2.1 Spaltung mit Endonucleasen 23

2.1.1 Partialspaltung mit Pankreas-RNase 23

2.1.2 Partialspaltung mit T2-RNase 26

2.2 Abbau von Fragmenten mit Exonucleasen 29

2.2.1 Abbau von Fragment Phe 38-76 mit Milz-Phosphodiesterase 31

2.2.2 Abbau von Fragment Phe 38-76 mit Schlangengift-Phosphodiesterase 33

Seite

2.2.3 Abbau von Fragment Phe 1-33 mit Schlangengift-Phosphodiesterase 34
3. Oligonucleotidanalysen der isolierten Fragmente 36
3.1 Analyse von Fragment Phe 17-73 36
3.2 Analyse von Fragment Phe 1-15 37
3.3 Analyse von Fragment Phe 48-76 37
3.4 Analyse von Fragment Phe 38-65/66 41
3.5 Analyse von Fragment Phe 1-27 42
4. Akzeptoraktivitäten von Fragmenten und Fragmentkombinationen für Phenylalanin 42
4.1 Untersuchungen über die Aminoacylierungsbedingungen von Fragmenten aus $tRNA^{Phe}$ 42
4.2 Vergleich der Akzeptoraktivitäten verschiedener Fragmentkombinationen 48
4.3 Spezifität der Aminoacylierung von Fragmentkombinationen 54
5. Untersuchungen zur Komplexbildung von Fragmenten aus $tRNA^{Phe}$ 55
6. Diskussion 60

IV. Beschreibung der Versuche 68
1. Materialien 68
2. Apparative Hilfsmittel 70
3. Methoden 71
3.1 Kulturbedingungen für die verwendeten Hefestämme 71
3.2 Isolierung von tRNA aus Hefe 72
3.3 Isolierung von Mitochondrien aus Hefe 72
3.4 Nachweis von Bakterien in mitochondrienhaltigen Niederschlägen 74
3.5 Inkubation der isolierten Mitochondrien mit Schlangengift-Phosphodiesterase 74
3.6 Isolierung von tRNA aus Mitochondrien 74
3.7 Isolierung von unfraktionierter Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Mitochondrien 75

Seite

3.8 Quantitative Bestimmung des mitochondrialen Proteins 75
3.9 Vorbereitung von Ionenaustauschern 76
3.10 Chromatographie von aminoacylierten tRNAs an benzoylierter DEAE-Cellulose 77
3.11 Enzymatische Spaltung von Seryl-tRNAs mit T1-RNase und Chromatographie der Hydrolysate an DEAE-Cellulose 78
3.12 Oligonucleotidanalyse 78
3.13 Reduktion von tRNA-Fragmenten mit Natriumborhydrid 80
3.14 Entfernen von Nucleasen aus einem Reaktionsgemisch 81
3.15 Isolierung von tRNA und tRNA-Fragmenten aus Säuleneluaten 81
3.16 Bestimmung der Akzeptoraktivität von unfraktionierter tRNA 82
3.17 Bestimmung der Akzeptoraktivität von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ und tRNA-Fragmenten 82
3.18 Beladung von unfraktionierter tRNA mit radioaktivem Serin in präparativen Mengen 83
3.19 Diskelektrophorese 84

V. Zusammenfassung der Ergebnisse 86
Literaturverzeichnis 88

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A	Adenosin
m^1A	1-Methyladenosin
BD-	benzoylierte Diäthylaminoäthyl-
C	Cytidin
m^5C	5-Methylcytidin
Cm	2'-O-Methylcytidin
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
G	Guanosin
Gesamt-tRNA	mitochondriale und cytoplasmatische tRNA
Gm	2'-O-Methylguanosin
m^7G	7-Methylguanosin
m^2G	2-Methylguanosin
$m_2^2G>p$	Cyclophosphat der Dimethylguanylsäure
mRNA	Matrizen-Ribonucleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
$tRNA^{Phe}$	Phenylalanin spezifische tRNA (und entsprechend andere)
$tRNA^{Phe}$ (HCl) $tRNA^{Phe}$	nach Herausspalten der Base aus Y
T	Ribothymidin
TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan
TCA	Trichloressigsäure
U	Uridin
hU	Dihydrouridin
hU^+	N-ribosyl-Ureidopropanol
Ψ	Pseudouridin
Y	Nucleosid neben Anticodon von $tRNA^{Phe}$, Formel siehe Ref. 145

I. Einleitung und Problemstellung

Der Ablauf der biologischen Proteinsynthese wurde in den letzten Jahren in den Grundzügen aufgeklärt (Übersicht Ref. 1, 2, 3). Die genetische Information für die Sequenz aller in der Zelle vorkommenden Proteine liegt in der Reihenfolge der Nucleotide in der Desoxyribonucleinsäure. Im Zellkern wird die Nucleotidsequenz der DNA in die Nucleotidsequenz der mRNA "übersetzt". Die mRNA wandert in das Cytoplasma und assoziiert mit Ribosomen. An den entstehenden Polysomen findet die Proteinsynthese statt. Jeweils drei aufeinanderfolgende Nucleotide der mRNA bilden ein Codon, das einer der zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren entspricht. Die Aminosäuren treten jedoch nicht direkt in Wechselwirkung mit der mRNA, sondern als Vermittler wirken die Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs). Diese Moleküle wurden bereits 1955 von Crick postuliert (4). Er forderte die Existenz von kleinen Adaptormolekülen, mit denen die Aminosäuren kovalent verknüpft werden, und die dann über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Matrizen-RNA in Wechselwirkung treten. Hoagland et al. (5) und Ogata und Nohara (6) fanden dann tatsächlich zwei Jahre später eine RNA-Fraktion, an die Aminosäuren kovalent gebunden werden konnten, und die auch sonst die Eigenschaften der von Crick postulierten Adaptormoleküle hatte. Die Fraktion wurde zunächst sRNA (soluble RNA) genannt, bis sich später der Name tRNA (Transfer-RNA) durchsetzte (Übersicht Ref. 7).

Für jede Aminosäure existiert mindestens eine spezifische tRNA, für die meisten Aminosäuren werden jedoch mehrere tRNAs gefunden (isoakzeptierende tRNAs). So erhält man bei der Fraktionierung von tRNA aus Hefe oder E. coli durch Chromatographie oder Gegenstromverteilung nicht 20 tRNA-Spezies, entsprechend den 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren, sondern 40 - 60 Gipfel mit Akzeptoraktivität. Bei höheren Organismen ist die Zahl der isoakzeptierenden tRNAs noch größer (23). Allerdings muß nicht jeder Gipfel mit Akzeptoraktivität einer eigenen tRNA-Spezies entsprechen, denn z. B. auch Aggregate und verschiedene konformative Formen einer tRNA können neue Spezies vortäuschen.

Man bezeichnet die Tatsache, daß es für eine Aminosäure mehrere tRNAs gibt als Multiplizität. Über die Ursache und biologische Bedeutung ist bisher wenig bekannt. Häufig steht die Multiplizität der tRNAs in Beziehung zur Degeneration des genetischen Codes: Für verschiedene synonyme Codons existieren auch verschiedene tRNAs mit der gleichen Aminosäurespezifität. Sehr oft spricht eine spezifische tRNA auf mehrere synonyme Codons, die sich nur in der dritten Base unterscheiden, gleich gut an. Hierfür gibt die Crick'sche "Wobble-Hypothese" eine Erklärung (24). Sie besagt in ihrer einfachsten Version, daß bei der dritten Base des Codons mehrere Arten von Basenpaarung mit der ersten Base des Anticodons zugelassen sind. So kann z. B. Inosin (das in einigen tRNAs an erster Stelle im Anticodon gefunden wurde) als komplementäre Base zu A, U und C wirken. $tRNA^{Ser}$ aus Hefe hat ein I im Anticodon und kann daher folgende drei Codons bedienen: UCC, UCU und UCA. Für die noch verbleibenden Codons (UCG, AGU und AGC) konnten in Hefe bisher keine $tRNA^{Ser}$-Spezies gefunden werden.

Die Degeneration des genetischen Codes reicht als Erklärung für die Multiplizität sicher nicht aus. Als weitere Ursache kommt unvollständige Modifizierung in Frage. Das gleichzeitige Vorkommen von U- und hU-haltiger $tRNA^{Ala}_{Hefe}$ (11) und von unmodifizierter, teilweise modifizierter und vollständig modifizierter $tRNA^{Tyr}_{E.\ coli}$ (25) seien als Beispiele hierfür genannt. Auch Suppressor-tRNAs d. h. tRNAs, die auf Grund einer Veränderung vor allem im Anticodon (26) aber auch in einer anderen Region (27) Stop-Codons bedienen können, tragen zur Zahl der vorkommenden tRNAs bei. In Neurospora crassa konnte ein Teil der beobachteten Multiplizität darauf zurückgeführt werden, daß die Mitochondrien eine eigene Population von tRNAs besitzen, welche offenbar zusammen mit spezifisch mitochondrialen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zur Synthese mitochondrialer Proteine benutzt werden (28). Ähnliche Befunde wurden inzwischen an anderen Organismen gemacht (Übersicht Ref. 29). Auch Chloroplasten verfügen über eigene tRNA-Spezies (z. B. 30).

Hinweise auf eine biologische Bedeutung der Multiplizität bieten experimentelle Befunde, die zeigen, daß isoakzeptierende tRNAs nicht nur bei der Proteinsynthese

mitwirken, sondern auch spezielle Funktionen übernehmen können. So wurde aus Staphylococcus epidermis eine $tRNA^{Gly}$ isoliert, die nur an der Zellwandsynthese beteiligt ist (31). Auch der Aminosäureeinbau in Glycerophosphatide scheint über Aminoacyl-tRNAs zu verlaufen (32). Die Funktion einer isoakzeptierenden tRNA als Enzyminhibitor wurde in Drosophila wahrscheinlich gemacht (33). Die Möglichkeit, daß bestimmte tRNA-Spezies an einer Regulation der Proteinsynthese auf der Translationsebene beteiligt sind, wird ebenfalls diskutiert (34).

Im Verlauf der Proteinbiosynthese übt eine tRNA zwei wichtige Funktionen aus:

a) Eine tRNA akzeptiert selektiv eine der zwanzig Aminosäuren über eine energiereiche Esterbindung.

b) Die Aminoacyl-tRNA wandert an den mRNA-Ribosomen-Komplex und wird spezifisch an das der Aminosäure entsprechende Basentriplett der mRNA gebunden. Es folgt die Übertragung der Aminosäure in die Peptidkette (Transferreaktion), wonach die tRNA wieder frei wird.

Um das spezifische Binden der tRNA an bestimmte Tripletts der mRNA zu erklären, wurde eine Trinucleotidesequenz auf der tRNA angenommen, das sogenannte Anticodon, dessen Nucleotide zu denen des Codons komplementär sind. Es ist durchaus möglich, daß zusätzliche Bereiche der tRNA an der Stabilisierung des Aminoacyl-tRNA-mRNA-Ribosomen-Komplexes beteiligt sind. Die eigentliche spezifitätsbestimmende Region für die Bindungsaktivität ist jedoch das Anticodon, welches für die einzelnen Aminosäuren verschieden ist.

Die zweite wichtige Funktion einer tRNA, die kovalente Verknüpfung mit der zugehörigen Aminosäure, wird unter Mitwirkung einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase durchgeführt, die folgende Reaktion katalysiert:

$$\text{Aminosäure} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Aminoacyl-AMP} + \text{Pyrophosphat}$$

$$\text{Aminoacyl-AMP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{Aminoacyl-tRNA} + \text{AMP}$$

Jede tRNA akzeptiert bei der Veresterung nur die ihr zugehörige Aminosäure, der

Einbau anderer natürlicher Aminosäuren liegt unter der Nachweisgrenze, die mit 1:10 000 angegeben wird (8). In der Proteinbiosynthese bestimmen allein die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen welche Aminosäuren an den tRNAs hängen und in die Peptidkette eingebaut werden (9). Die Wechselwirkung zwischen tRNA und mRNA ist unabhängig von der Art der gebundenen Aminosäure. Voraussetzung für eine fehlerfreie Proteinsynthese ist daher eine mit hoher Spezifität verbundene Wechselwirkung zwischen tRNA und Synthetase. Auf Grund des relativ kleinen Molekulargewichtes (25-30 000) ist das tRNA-Molekül besonders gut zur Untersuchung spezifischer Nucleinsäure-Proteinwechselwirkung geeignet, die ganz allgemein bei vielen Vorgängen in der Zelle von großer Bedeutung sind (Übersicht Ref. 10).

Die Frage, welches Strukturelement in der tRNA von der Aminoacyl-tRNA-Synthetase erkannt wird, ist noch immer unbeantwortet. Das Problem ist vor allem deshalb so schwierig, weil über die zwei- und dreidimensionale Struktur nur wenig bekannt ist. Bereits nach der ersten Strukturaufklärung einer tRNA wurde von Holley und Mitarbeitern erkannt, daß es möglich ist, die Nucleotidkette durch intramolekulare Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren (A:U, G:C) zu einer Sekundärstruktur in Form eines Kleeblattes anzuordnen (11). Obwohl dieses Kleeblattmodell bisher keinesfalls streng bewiesen wurde, wird es für die zweidimensionale Darstellung der bekannten tRNAs heute allgemein verwendet. Es gibt jedoch viele Hinweise darauf, daß ein planares Kleeblattmodell nicht ausreicht, um die vollständige Struktur einer tRNA zu beschreiben. Man muß vielmehr annehmen, daß das Molekül eine definierte dreidimensionale Struktur hat, deren Aufklärung erst mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse möglich sein wird. Dreidimensionale Modelle wurden von mehreren Autoren diskutiert (12-17, Übersicht Ref. 18 und Ref. 19).

Bei der Suche nach Regionen der Raumstruktur oder Nucleotidsequenzen der tRNA, die an der spezifischen Synthetaseerkennung beteiligt sind, wurden bisher im wesentlichen drei experimentelle Methoden angewendet:

a) Das tRNA-Molekül wird chemisch modifiziert und die Auswirkung auf die Akzeptoraktivität untersucht.

b) Strukturvergleich isoakzeptierender tRNAs. Bei dieser Methode wird angenommen, daß verschiedene tRNAs, die vom gleichen Enzym aminoacyliert werden, identische spezifitätsbestimmende Regionen haben.

c) Fragmentmethode: Das tRNA-Molekül wird chemisch oder enzymatisch gespalten und die isolierten Fragmente allein oder nach Rekombination mit anderen Fragmenten auf ihre Akzeptoraktivität untersucht.

Keine der Methoden hat bisher zu einem eindeutigen Ergebnis geführt (Übersicht Ref. 20). Hypothesen hinsichtlich der Synthetaseerkennungsregion wurden von Schulman et al. (21) und Dudock et al. (22) aufgestellt.

In der vorliegenden Doktorarbeit werden Beiträge zu den beiden beschriebenen Problemen der tRNA-Forschung geliefert: Der Multiplizität von tRNA und der spezifischen Wechselwirkung zwischen tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Zunächst wurde untersucht, ob Mitochondrien aus Hefe eigene serinspezifische tRNAs enthalten, die dazu beitragen, daß bei der chromatographischen Fraktionierung von tRNA aus Brauereihefe für Serin eine mehrgipfelige Akzeptoraktivitätskurve gefunden wird. Im zweiten Teil der Arbeit werden Untersuchungen über die Synthetaseerkennungsregion von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ beschrieben. Durch enzymatische Partialspaltung von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ wurden Fragmente dargestellt, deren Akzeptoraktivität allein und nach Kombination mit anderen Bruchstücken untersucht wurde.

II. Serinspezifische Transfer-Ribonucleinsäuren aus Hefe-Mitochondrien

1. Einleitung

Zahlreiche Forschungsergebnisse aus den letzten Jahren scheinen eine alte Hypothese zu bestätigen, nach der Mitochondrien halb-autonome Organellen in eukaryonten Zellen sind (Übersicht Ref. 29). Nachdem in Mitochondrien DNA nachgewiesen

worden war, die als Träger genetischer Information dienen kann, begann die Suche nach Elementen der Proteinbiosynthese wie Ribosomen, tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sowie Initiations- und Elongationsfaktoren. Inzwischen wurde von mehreren Arbeitsgruppen berichtet, daß Mitochondrien aus Neurospora crassa (28, 35-38) Hefe (39-44), Tetrahymena (45), Rattenleber (46-48) und HeLa-Zellen (49) eigene tRNAs besitzen, die sich häufig von den cytoplasmatischen tRNAs chromatographisch unterscheiden (36, 38, 43, 45-48). In Mitochondrien gibt es offensichtlich auch eigene tRNA-Spezies, die die für den Start der Peptidkette erforderliche Aminosäure transportieren (50, 51, 52). Hybridisierungsversuche mit mitochondrialer tRNA aus Rattenleber (53, 54) und Hefe (44, 55, 56) haben gezeigt, daß zumindest einige tRNA-Spezies von der mitochondrialen DNA codiert werden können. Auch mitochondrienspezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurden bei einigen Organismen nachgewiesen (28, 35, 45, 46).

Die bisher zitierten Ergebnisse zeigen, daß mitochondriale Spezies zur Multiplizität der tRNAs beitragen können. Bei der Fraktionierung von tRNA aus Brauereihefe an benzoylierter DEAE-Cellulose wurde für Serin eine mehrgipfelige Akzeptoraktivitätskurve, entsprechend mehreren $tRNAs^{Ser}$, gefunden. Um zu zeigen, daß einige dieser serinspezifischen tRNAs aus Mitochondrien stammen, wurde mitochondriale tRNA und tRNA aus ganzen Zellen chromatographisch verglichen.

Eine andere Möglichkeit dieses Problem zu lösen, bieten bestimmte cytoplasmatische Hefemutanten, die sog. petite-Mutanten. Die Änderungen im Phänotyp dieser Mutanten werden durch die Änderungen oder den Verlust eines genetischen Faktors verursacht, der bei Kreuzungen der Mutante mit dem Wildtyp nicht nach den Mendelschen Gesetzen vererbt wird. Alle Beobachtungen weisen darauf hin, daß dieser genetische Faktor auf der mitochondrialen DNA lokalisiert ist (57, 58). Petite-Mutanten können durch Ethidiumbromidbehandlung induziert werden. Auf diese Weise wurden in den letzten Jahren auch Mutanten isoliert, die keine mitochondriale DNA mehr haben (59-62), und die daher in den Mitochondrien auch keine genetische Information für eigene tRNAs besitzen. Ein chromatographischer Vergleich der tRNAs aus einer petite-Mutante ohne mitochondriale DNA

und dem zugehörigen Wildtyp bietet daher ebenfalls eine Möglichkeit, den Beitrag der mitochondrialen Spezies zur Multiplizität der tRNAs zu untersuchen.

Die in dem Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden vor allem aus Versuchen mit dem haploiden Hefestamm S. cerevisiae α S288C erhalten. Die Vorteile dieses genetisch definierten Stammes bei der Untersuchung der tRNA-Multiplizität wurden von G. R. Fink ausführlich beschrieben (63).

2. Isolierung von Mitochondrien aus Hefe und Extraktion der mitochondrialen tRNA.

Alle bisher beschriebenen Methoden zur Isolierung von Hefemitochondrien beginnen entweder mit einem mechanischen oder enzymatischen Aufschluß der Zellen (Übersicht Ref. 64). Für den mechanischen Aufschluß wurden verschiedene Apparate konstruiert und beschrieben. Bei dem von mir benutzten Merkenschlager-Desintegrator wurde eine Suspension von Hefe und Glasperlen in einem Puffer kräftig geschüttelt und so die Zellwände der Hefe zerstört. In anderen Versuchen wurden die Zellwände enzymatisch aufgeschlossen. Zu diesem Zweck wurde die Hefe mit Helicase, einem Rohextrakt aus dem Darm der Weinbergschnecke, inkubiert. Der Verdauungssaft dieser Weichtiere enthält in hoher Konzentration ß-Glucuronidase. Dieses Enzym hydrolysiert die in der Zellwand von Hefe enthaltenen ß-Glucuronide, wobei D-Glucuronsäuren frei werden. Die entstehenden Protoplasten lassen sich osmotisch lysieren (65).

Da ich sowohl einen mechanischen Zellhomogenisator als auch Helicase für die Mitochondrienisolierung benutzt habe, ist ein Vergleich beider Methoden möglich. Elektronenmikroskopaufnahmen zeigten, daß die auf mechanischem Wege isolierte Mitochondrienfraktion zahlreiche Verunreinigungen enthielt, bei denen es sich um Zelltrümmer oder Reste von ausgelaufenen Mitochondrien handeln dürfte (Abb. 1). Durch Gradientenzentrifugation wurde nur ein Teil der Verunreinigungen abgetrennt. Hingegen sahen die nach enzymatischen Abbau der Zellwände isolierten Mitochondrien im Elektronenmikroskop ziemlich sauber und unbeschädigt aus

(Abb. 2). Eine weitere Reinigung im Saccharosegradienten wurde daher nicht durchgeführt. Ein Vergleich der beiden benutzten Methoden zeigt also, daß mit der enzymatischen Methode sauberere und weniger beschädigte Mitochondrien erhalten werden. Da die Zellen jedoch mit Helicase nur dann zu Protoplasten abgebaut werden konnten, wenn die Hefe in der logarithmischen oder frühen stationären Phase geerntet wurde, läßt sich käufliche Brauerei- oder Bäckerhefe für diese Methode nicht gebrauchen.

Aus 100 g Brauerei- oder Bäckerhefe wurden bei Anwendung des Merkenschlager-Desintegrators etwa 250-460 mg mitochondriales Protein erhalten. Wurden diese Rohmitochondrien im Saccharosegradienten zentrifugiert, so enthielt die rotbraune Mitochondrienbande noch etwa 30-50 % der aufgetragenen Proteinmenge. Aus den so gereinigten Mitochondrien wurden durchschnittlich 0,15 A_{260}-Einheiten tRNA pro mg Protein extrahiert. Aus 100g Zellen der Hefe S. cerevisiae α S288C ließen sich nach enzymatischem Abbau der Zellwände und Lyse der Protoplasten etwa 200-380 mg mitochondriales Protein und 45-88 A_{260}-Einheiten mitochondriale tRNA isolieren, was etwa 0,22 A_{260}-Einheiten tRNA pro mg Protein entspricht. Diese letzten Angaben beziehen sich auf Mitochondrien, die vor Isolierung der tRNA mit Schlangengift-Phosphodieterase inkubiert worden waren, um extramitochondriale tRNA abzubauen.

Da aus dem Waschpuffer von Mitochondrien tRNA isoliert werden konnte, die die getesteten Aminosäuren Serin und Tyrosin akzeptierte, muß man annehmen, daß cytoplasmatische tRNA an den Organellen adsorbiert war. Um diese extramitochondriale tRNA abzubauen, wurden die Mitochondrien wie beschrieben (Methoden 3.5.) mit Schlangengift-Phosphodiesterase inkubiert. In zwei Kontrollversuchen wurde gezeigt, daß nach dieser Nucleasebehandlung extramitochondriale tRNA keine Aminosäuren mehr akzeptierte. Im ersten Kontrollversuch wurden $4A_{260}$-Einheiten $tRNA_{Hefe}$ in 1,0 ml 0,65 M Mannit, 0,01 M TRIS-Acetat p_H = 7,8 mit 60 Einheiten Schlangengift-Phosphodiesterase 10 Min. bei 30°C Inkubiert. Die so behandelte tRNA ließ sich nicht mehr mit Serin und Tyrosin beladen. In einem zweiten Kontrollversuch sollte gezeigt werden, daß tRNA unter den beschriebenen Bedingungen auch in

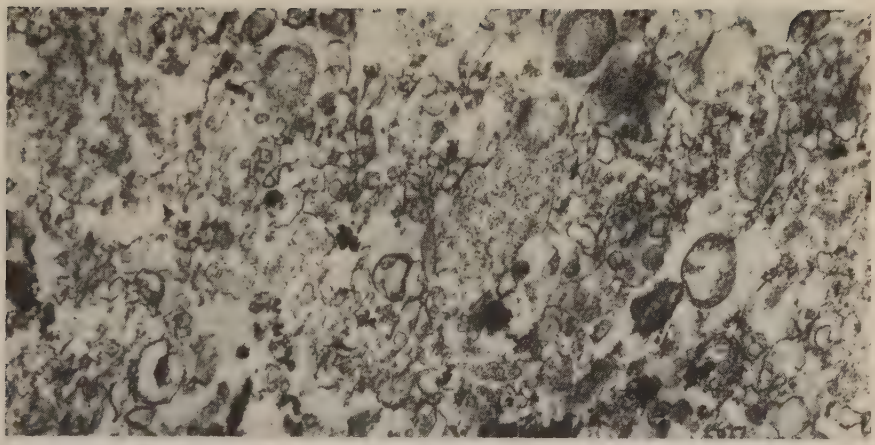

Abbildung 1: Elektronenmikroskopaufnahme eines Mitochondrienniederschlages (Vergrößerung 1 : 21 000).

Brauereihefe wurde mechanisch mit dem Merkenschlager-Desintegrator aufgeschlossen. Die weitere Fraktionierung des Zellhomogenats und die Reinigung der Mitochondrien durch Zentrifugation im Saccharosegradienten erfolgte wie beschrieben (Methoden 3. 3.). Die Mitochondrien wurden in Glutaraldehyd und Phosphatpuffer pH = 6, 9 fixiert.

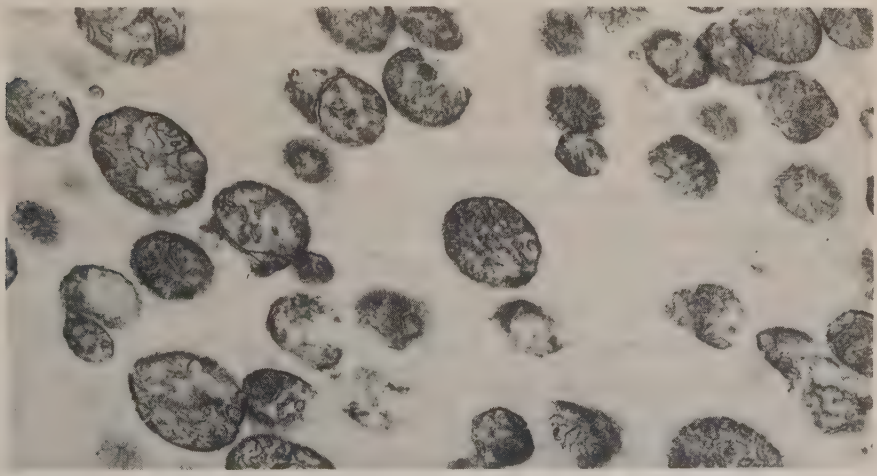

Abbildung 2: Elektronenmikroskopaufnahme eines Mitochondrienniederschlages (Vergrößerung 1 : 21 000).

Zellen des Hefestammes S. cerevisiae aS288C wurden mit Helicase zu Protoplasten abgebaut. Der weitere Aufschluß und die Reinigung der Mitochondrien erfolgte wie beschrieben (Methoden 3. 3.). Die Mitochondrien wurden in Glutaraldehyd und Phosphatpufer pH = 6, 9 fixiert.

Gegenwart von Mitochondrien abgebaut wurde. Zu diesem Zweck wurde ein Mitochondrienniederschlag (140 mg Protein) einmal mit Mannitmedium (Methoden 3.3.) gewaschen, dann in 10 ml 0,65 M Mannit, 0,01 M TRIS-Acetat p_H = 7,8 suspendiert und in zwei gleich große Aliquots zu je 5 ml aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit 60 Einheiten Schlangengift-Phosphodiesterase 10 Min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondrien abzentrifugiert, zweimal mit kaltem Mannitmedium gewaschen und aus den vereinigten Überständen nach Phenolbehandlung die tRNA isoliert. Das zweite Aliquot wurde in der gleichen Weise behandelt, jedoch erfolgte vorher keine Inkubation mit Nuclease. Die tRNA aus dem Überstand der nicht mit Nuclease behandelten Mitochondrien konnte mit Serin (20 p Mol/A_{260}-Einheiten tRNA) und mit Tyrosin (25 p Mol/A_{260}-Einheit tRNA) beladen werden. Hingegen ließ sich die tRNA aus dem Überstand von nucleasebehandelten Mitochondrien nicht oder nur sehr gering mit den genannten Aminosäuren aminoacylieren. Aus den Ergebnissen dieser Kontrollversuche läßt sich entnehmen, daß die aus nucleasebehandelten Mitochondrien isolierte tRNA nur wenig oder überhaupt nicht durch extramitochondriale, aminoacylierbare tRNA verunreinigt sein kann. Da die mitochondriale tRNA im Polyacrylamidgel einheitlich wanderte und keine tRNA-Fragmente auftraten, muß man annehmen, daß die Schlangengift-Phosphodiesterase nicht in die Mitochondrien eindringt.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die Mitochondrienfraktion mit Bakterien verunreinigt war, wurde stets mit sterilen Glasgefäßen und Puffern gearbeitet. Die tatsächliche Bakterienkonzentration ließ sich bestimmen, indem bei mehreren Versuchen ein Aliquot der Mitochondriensuspension auf Agar-Platten ausgestrichen und einige Zeit inkubiert wurde (Methoden 3.4.). So ergab sich, daß 100 mg mitochondriales Protein durchschnittlich etwa durch 1×10^5 Bakterien verunreinigt waren. Da aus Messungen von U. Hänggi in unserem Labor bekannt ist, daß 2×10^8 E. coli-Zellen etwa 1 mg wiegen, entsprechen 1×10^5 Bakterien etwa 0,001 mg. Diese Verunreinigung ist so klein, daß sie bei der Interpretation der folgenden Ergebnisse nicht berücksichtigt werden braucht.

3. Vergleich der Akzeptoraktivitäten von tRNA aus ganzen Zellen und aus Mitochondrien

Da bekannt ist (28, 35, 45, 46), daß Mitochondrien aus verschiedenen Organismen eigene Aminoacyl-tRNA-Synthetasen enthalten, wurde versucht, auch aus Hefemitochondrien ein Synthetasepräparat herzustellen. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien mit Ultraschall aufgeschlossen, die Ribosomen abzentrifugiert und aus dem Überstand die Proteine mit Ammoniumsulfat ausgefällt (Methoden 3.7.). Der gelöste Niederschlag konnte tRNA mit Aminosäuren beladen, verlor diese Aktivität aber bereits nach einigen Tagen. Die in Tabelle 1 angegebenen Werte für die Akzeptoraktivitäten von Gesamt-tRNA und mitochondrialer tRNA sind Mittelwerte aus mehreren Experimenten, bei denen sowohl tRNAs als auch unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus verschiedenen Aufarbeitungen benutzt wurden. Man sieht, daß das mitochondriale Enzym die mitochondriale tRNA besser und die Gesamt-tRNA schlechter belädt als die Synthetase aus ganzen Zellen. Die Ergebnisse erlauben jedoch nicht, von einer ausgesprochenen Spezifität der mitochondrialen Aminoacyl-tRNA-Synthetase zu sprechen.

Tabelle 1: Vergleich der Akzeptoraktivitäten von Gesamt-tRNA und mitochondrialer tRNA aus dem Hefestamm S. cerevisiae α S288C

	Akzeptoraktivität *)					
	Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus ganzen Zellen			Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Mitochondrien		
	Ser	Leu	Met	Ser	Leu	Met
tRNA aus Gesamthefe	65	85	38	40	55	25
tRNA aus Mitochondrien	15	10	6	23	12	6

*) pMol Aminosäure/A_{260}-Einheiten tRNA

Die niedrige Akzeptoraktivität von mitochondrialer tRNA beruhte nicht darauf, daß das CCA-Ende unvollständig war, denn Inkubation in Gegenwart von CTP und CCA-Transferase brachte keinen Anstieg. Bei Inkubation der homologen Komponenten (tRNA und Synthetase aus Mitochondrien) in Gegenwart von 0,8 M und 1,2 M $(NH_4)_2SO_4$ wurde ein Abfall der Akzeptoraktivität beobachtet, während bei einer Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration (0,4, 0,6, und 0,8 mM $MgCl_2$) das Ausmaß der Aminoacylierung konstant blieb.

Die häufig diskutierte Verwandtschaft zwischen der mitochondrialen und bakteriellen Proteinbiosynthese wird unter anderem durch den Befund unterstützt, daß in einem in vitro-System Elongationsfaktoren aus E. coli die entsprechenden Faktoren aus Hefemitochondrien ersetzen können (67). Analog zu diesen Experimenten wurde daher versucht, tRNA aus Hefemitochondrien durch Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus E. coli mit Serin zu beladen. Es zeigte sich jedoch, daß eine heterologe Aminoacylierung nicht oder nur in einem sehr geringen Ausmaß möglich war. Da Thiebe und Zachau beschrieben haben, daß für die heterologe Beladung von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus E. coli hohe Ammoniumsulfat-Konzentrationen erforderlich sind (68) wurde versucht, mitochondriale tRNA in Gegenwart von 1,2 M $(NH_4)_2SO_4$ durch Synthetase aus E. coli zu aminoacylieren. Auch unter diesen Bedingungen war jedoch eine heterologe Beladung der mitochondrialen tRNA nicht möglich.

4. Enzymatische Hydrolyse der Seryl-tRNAs aus ganzen Zellen und aus Mitochondrien mit T1-RNase und chromatographischer Vergleich der Seryl-Oligonucleotide.

Um festzustellen, ob sich die serinspezifischen tRNAs aus Mitochondrien und ganzen Zellen möglicherweise bereits in ihrer Nucleotidsequenz nahe dem 3'-Ende unterscheiden, wurden ähnliche Experimente ausgeführt, wie sie von Smith und Herbert (69) bzw. Ishida und Miura (70) beschrieben wurden. Unfraktionierte tRNA aus ganzen Zellen des haploiden Hefestammes α S288C wurde mit ^{14}C-Serin und unfraktionierte tRNA aus Mitochondrien mit ^{3}H-Serin beladen. Die beiden tRNAs

wurden vereinigt, bei p_H = 5,2 mit T1-RNase hydrolysiert und an einer DEAE-Cellulose-Säule chromatographiert. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß die Radioaktivitätsgipfel der ^3H- und der ^{14}C-Aktivität vollständig überlappen und neben einem Hauptgipfel keine anderen signifikanten Gipfel der Radioaktivität auftreten. Da die hauptsächlichen serinspezifischen tRNAs nach den Sequenzanalysen eine - GpCpCpA - Endgruppe besitzen (71), kann aus diesem Befund geschlossen werden, daß auch in serinspezifischen tRNAs aus Mitochondrien die gleiche Endgruppe vorliegt.

5. Vergleich von mitochondrialer tRNA und Gesamt-tRNA durch Chromatographie der Seryl-tRNAs an benzoylierter DEAE-Cellulose

Die Fraktionierung von tRNAs durch Chromatographie an benzoylierter DEAE-Cellulose wurde zuerst von Gillam et al. beschrieben (72) und hat sich inzwischen für die Reindarstellung zahlreicher Spezies bewährt. Bei der Chromatographie von unfraktionierter, mit radioaktivem Serin beladener tRNA aus Brauereihefe an BD-Cellulose wurden durch Elution mit einem Salzgradienten ein Hauptgipfel und mehrere Nebengipfel mit Serinaktivität erhalten. Im Unterschied dazu zeigte das Elutionsprofil von beladener unfraktionierter tRNA aus dem haploiden Hefestamm α S288C praktisch nur einen Gipfel mit Serinaktivität, der sich chromatographisch ähnlich wie der Hauptgipfel aus Brauereihefe verhielt (Abb. 4). Bei allen BD-Säulen wurde ein Teil der Radioaktivität mit Äthanol eluiert. Vermutlich handelte es sich hierbei nicht um eigene $tRNA^{Ser}$-Spezies, sondern vielmehr um unspezifisch adsorbierte tRNA. Hierfür spricht die Tatsache, daß der Anteil dieses Radioaktivitätsgipfels an der Gesamtaktivität sehr unterschiedlich war.

Durch Cochromatographie an BD-Cellulose wurden unfraktionierte, mit ^3H- bzw. ^{14}C-Serin beladene tRNAs aus Mitochondrien und ganzen Zellen des Hefestammes α S288C verglichen (Abb. 5 und Abb. 6). Für die Beladung der mitochondrialen tRNA wurde entweder eine unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Mitochondrien (Abb. 6) oder aus ganzen Zellen benutzt (Abb. 5). Aus den genannten Abbildungen ist zu ersehen, daß bei der mitochondrialen tRNA zusätzlich zum

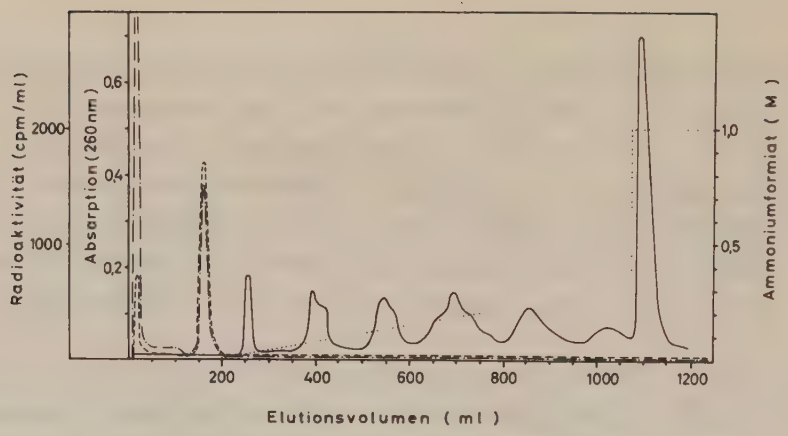

Abbildung 3: Cochromatographie der Oligonucleotide nach T1-RNase-Spaltung von unfraktionierten, mit Serin beladenen tRNAs aus Mitochondrien und ganzen Zellen von S. cerevisiae α S288C an einer DEAE-Cellulose-Säule. Für die Aminoacylierung wurde jeweils die homologe unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase verwendet. (•—•—•) ^{14}C-cpm der Seryl-tRNA aus Mitochondrien, (-----) ^{3}H-cpm der Seryl-tRNA aus ganzen Zellen, (———) Absorption bei 260 nm

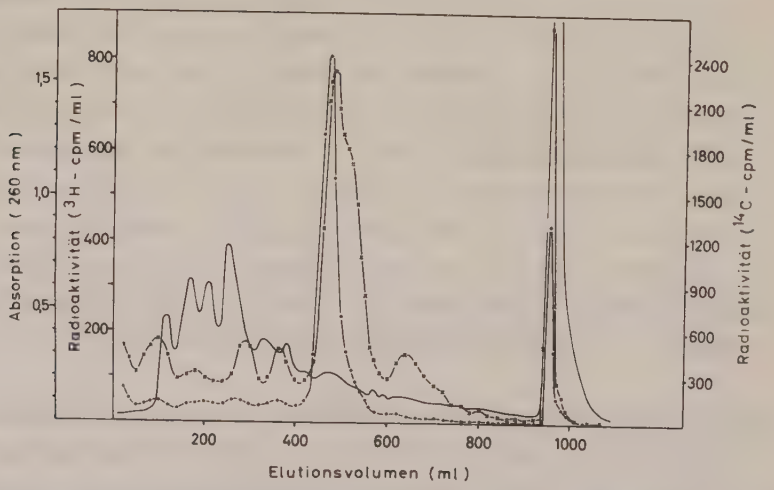

Abbildung 4: Cochromatographie von unfraktionierten mit Serin beladenen tRNAs aus Brauereihefe und S. cerevisiae α S288C an einer BD-Cellulose-Säule. Für die Aminoacylierung wurde jeweils die homologe unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase verwendet. (•—•—•) ^{14}C-cpm der Seryl-tRNA aus S. cerevisiae α S288C, (x—x—x) ^{3}H-cpm der Seryl-tRNA aus Brauereihefe (———) Absorption bei 260 nm

Hauptgipfel noch einige Nebengipfel auftreten, die sich chromatographisch ähnlich wie die Nebengipfel aus der Gesamt-tRNA von Brauereihefe verhalten. Wenn ein Aliquot der Gesamt-tRNA aus dem Stamm ♂ S288C durch Synthetase aus Mitochondrien und ein anderes Aliquot durch Synthetase aus ganzen Zellen aminoacyliert wurde, so erhielt man nach Cochromatographie der mit verschiedenen Enzymen beladenen gleichen tRNAs identische Elutionsprofile, bei denen jeweils nur ein Hauptgipfel mit Serinaktivität auftrat. Bei der Beladung durch mitochondriale Synthetase wurden im Elutionsprofil also keine zusätzlichen Gipfel beobachtet, die mitochondrialen $tRNA^{Ser}$-Spezies entsprechen könnten.

Der chromatographische Vergleich von mitochondrialer tRNA und Gesamt-tRNA wurde mehrmals wiederholt, wobei tRNAs aus verschiedenen Aufarbeitungen benutzt wurden.

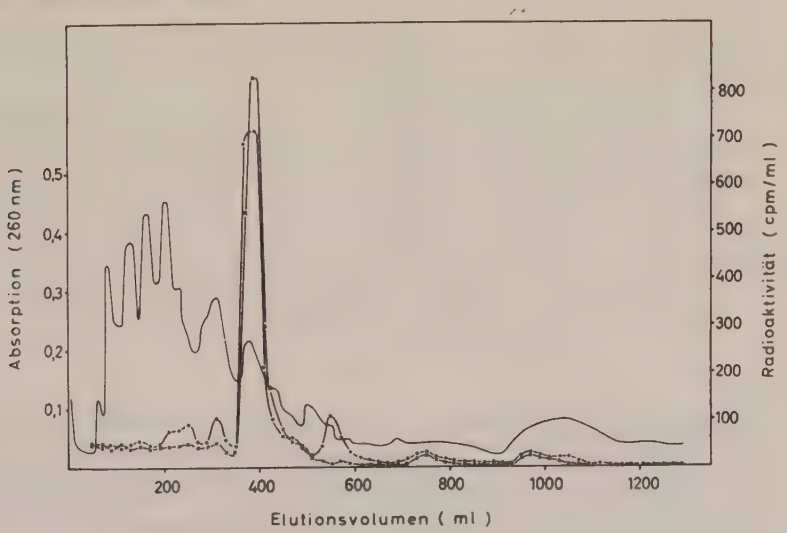

Abbildung 5: Cochromatographie von unfraktionierten mit Serin beladenen tRNAs aus Mitochondrien und ganzen Zellen von S. cerevisiae ♂ S288C an einer BD-Cellulosesäule. Für die Aminoacylierung wurde bei beiden tRNAs unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus ganzen Zellen von S. cerevisiae ♂ S288C verwendet. (x—x—x) ^{14}C-cpm der Seryl-tRNA aus ganzen Zellen, (•—•—•) ^{3}H-cpm der Seryl-tRNA aus Mitochondrien (———) Absorption bei 260 nm.

Bei vier Versuchen traten die in Abb. 6 gezeigten chromatographischen Unterschiede auf, bei zwei Versuchen gab es keine nennenswerten Unterschiede. Das Auftreten von Nebengipfeln mit Serinaktivität bei der mitochondrialen tRNA war unabhängig davon, ob die tRNA nach der Beladung durch Säurefällung oder durch Chromatographie über eine Sephadex G 25-Säule von freier Aminosäure und ATP abgetrennt wurde. Auch wurde ausgeschlossen, daß Verunreinigungen in den radioaktiven Aminosäuren die Nebengipfel verursachen, denn die Elutionsprofile sahen identisch aus, wenn die mitochondriale tRNA einmal mit ^{3}H-Serin und einmal mit ^{14}C-Serin beladen war.

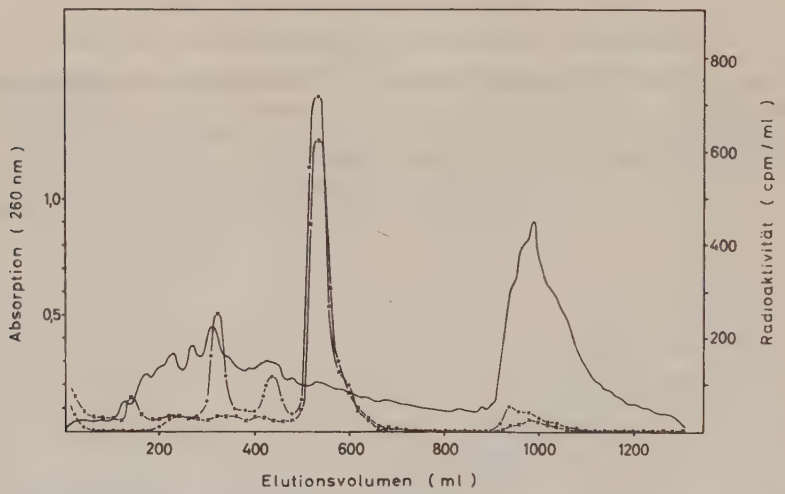

Abbildung 6: Cochromatographie von unfraktionierten mit Serin beladenen tRNAs aus Mitochondrien und ganzen Zellen von S. cerevisiae S288C an einer BD-Cellulosesäule. Für die Aminoacylierung wurde jeweils die homologe unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase verwendet. (•—•—•) ^{14}C-cpm der Seryl-tRNA aus Mitochondrien, (x—x—x) ^{3}H-cpm der Seryl-tRNA aus ganzen Zellen, (———) Absorption bei 260 nm.

6. Vergleich der tRNA aus einer petite-Mutante ohne mitochondriale DNA mit der tRNA aus dem Wildtyp des gleichen Hefestammes durch Chromatographie der Seryl-tRNAs an benzoylierter DEAE-Cellulose.

Von verschiedenen Autoren (59-62) wurde berichtet, daß sie durch Ethidiumbromidbehandlung petite-Mutanten induzieren konnten, bei denen sich keine mitochondriale DNA nachweisen ließ. Diese Mutanten sollten auch keine von mitochondrialer DNA codierten tRNAs besitzen. Ein chromatographischer Vergleich der tRNA einer solchen petite-Mutante mit der tRNA des zugehörigen Wildtyps bietet daher eine Möglichkeit, mitochondrienspezifische tRNA-Spezies nachzuweisen.

Die bei meinen Versuchen verwendete petite-Mutanten S. cerevisiae 25a-7EB (haploid) besitzt keine mitochondriale DNA, und wurde zusammen mit dem zugehörigen Wildtyp 25a von T. Bech-Hansen, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, zur Verfügung gestellt, der ebenfalls an dem Problem der mitochondrienspezifischen tRNAs interessiert ist. Beim Vergleich der Seryl-tRNAs aus dem Wildtyp und der petite-Mutante durch Cochromatographie an BD-Cellulose wurden im Elutionsprofil keine Unterschiede beobachtet. Es trat jeweils nur ein Gipfel mit Serinaktivität auf, der sich bei beiden tRNAs chromatographisch gleich verhielt. Die tRNAs aus beiden Stämmen wurden bei diesem Versuch durch unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Brauereihefe mit Serin beladen.

7. Diskussion

Die ausführlichsten Untersuchungen über mitochondriale tRNA wurden bisher an Neurospora crassa (28, 35-38) und an Rattenleber (46, 47, 48, 54) durchgeführt, da aus diesen Organismen relativ einfach Mitochondrien und damit auch mitochondriale tRNAs isoliert werden können. Auch für die Darstellung von Hefemitochondrien sind zahlreiche Methoden beschrieben (65). Bei meinen eigenen Versuchen wurde die Hefe entweder mechanisch mit dem Merkenschlager-Desintegrator oder enzymatisch mit Helicase aufgeschlossen. Ein Vergleich der nach diesen beiden Methoden erhaltenen Mitochondrienfraktionen im Elektronenmikroskop zeigt, daß

durch enzymatischen Abbau mit Helicase und Lyse der Protoplasten eine bessere Ausbeute an sauberen, unbeschädigten Mitochondrien erhalten wird als durch mechanischen Aufschluß der Zellen.

Bei den von anderen Autoren beschriebenen Untersuchungen über mitochondriale tRNA aus Hefe (39, 42-44) wurden keine besonderen Prozeduren angewendet, um reine Mitochondrien zu erhalten. So isolierten Accoceberry et al. (42, 43) tRNA aus Mitochondrien, die nach mechanischem Aufschluß mit Glasperlen weder durch Gradientenzentrifugation gereinigt noch durch Inkubation mit Nucleasen von cytoplasmatischer tRNA befreit worden waren. Es ist daher anzunehmen, daß die so isolierte tRNA-Fraktion auch cytoplasmatische tRNA enthielt. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, daß die genannten Autoren die mitochondriale tRNA in einer relativ hohen Ausbeute erhielten, die etwa 0,7 A_{260}-Einheiten/mg mitochondriales Protein betrug und damit dreimal so groß war wie die von mir aus Nuclease-behandelten Mitochondrien isolierte Menge (etwa 0,22 A_{260}-Einheiten/mg Protein).

Ein Vergleich der Akzeptoraktivitäten zeigt, daß mitochondriale tRNA wesentlich schlechter mit den getesteten Aminosäuren beladen wurde als Gesamt-tRNA (vergleiche Tabelle 1). Unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Mitochondrien aminoacyliert die homologe tRNA im Falle von Serin und Leucin etwas besser und die Gesamt-tRNA etwas schlechter als die Synthetase aus ganzen Zellen. In diesem Zusammenhang muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß sich nicht mit Sicherheit sagen läßt, ob die Synthetase wirklich aus den Mitochondrien stammt, denn eine Verunreinigung der Mitochondrienfraktion durch cytoplasmatische Synthetase ist nicht auszuschließen. Accoceberry et al. (42) fanden ebenfalls für die mitochondriale tRNA eine geringere Akzeptoraktivität als für die cytoplasmatische. Sie isolierten zwar unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Mitochondrien, berichteten aber, daß dieses Enzym sowohl die mitochondriale wie auch die cytoplasmatische tRNA sehr schlecht aminoacylierte und nur kurze Zeit haltbar war.

Beim chromatographischen Vergleich von mitochondrialer und cytoplasmatischer tRNA wurden bei mehreren Organismen Unterschiede festgestellt (36, 38, 43, 45-48).

In einer vor kurzem erschienen Arbeit von Accoceberry et al. (43) wurde berichtet, daß sich in Hefe die Arginyl-, Lysyl-, Phenylalanyl- und Isoleucyl-tRNAs aus Mitochondrien von den entsprechenden cytoplasmatischen Spezies unterscheiden, wenn sie durch "reversed-phase"-Chromatographie verglichen wurden. Bei den eigenen Untersuchungen wurden die Seryl-tRNAs aus Mitochondrien und ganzen Zellen der Hefe S. cerevisiae α S288C durch Cochromatographie an BD-Cellulose verglichen. Im Elutionsprofil der mit radioaktivem Serin beladenen mitochondrialen tRNA wurde bei vier von sechs Versuchen außer dem Hauptgipfel, der chromatographisch identisch ist mit dem einzigen Gipfel aus Gesamt-tRNA, noch zwei bis drei relativ kleine Radioaktivitätsgipfel beobachtet. Es ist praktisch ausgeschlossen, daß die Nebengipfel durch bakterielle tRNA verursacht worden sind, da die Zahl der in den Mitochondrien gefundenen Bakterien zu gering war. Andererseits ist es durchaus möglich, daß während der Isolierung ein Teil der $tRNA^{Ser}$-Spezies aus dem Hauptgipfel modifiziert wurde und so zusätzliche Gipfel entstanden sind.

Die durchgeführten Experimente erbrachten kein eindeutiges Ergebnis. Da jedoch bei der Mehrzahl der Cochromatographieversuche im Elutionsprofil der mitochondrialen tRNA zusätzliche Radioaktivitätsgipfel auftraten, und außerdem die mitochondriale tRNA besser durch mitochondriale Aminoacyl-tRNA-Synthetase als durch Synthetase aus ganzen Zellen mit Serin aminoacyliert wird, kann man die Ergebnisse als Hinweis darauf werten, daß Hefemitochondrien über eigene serinspezifische tRNAs verfügen.

Der Hefestamm S. cerevisiae α S288C wurde für die Untersuchungen zum Problem der Multiplizität gewählt, da dieser Stamm genetisch definiert ist und im Unterschied zur polyploiden Brauereihefe einen haploiden Chromosomensatz hat. Es war geplant, die Untersuchungen auf Brauereihefe auszudehnen, wenn bei dem Stamm α S288C mitochondrienspezifische Seryl-tRNAs nachgewiesen werden konnten. Da aber mit Hilfe der angewendeten Methoden offensichtlich keine eindeutigen Aussagen zu diesem Problem erhalten werden können, wurden keine weiteren Versuche mit Brauereihefe durchgeführt.

III. Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen $tRNA^{Phe}$ und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe mit Hilfe von Fragmenten aus $tRNA^{Phe}$.

1. Einleitung

Für die Darstellung von Fragmenten aus tRNA gibt es zwei Methoden: Die enzymatische Partialspaltung und die chemische Spaltung an besonders reaktiven Stellen im Polynucleotidstrang. Die erste tRNA-Partialspaltung wurde von Nishimura und Novelli beschrieben (73, 74). Sie beobachteten, daß bei der Behandlung von unfraktionierter tRNA aus E. coli mit RNase aus B. subtilis oder T1-RNase in Gegenwart von Magnesiumionen die Akzeptoraktivität noch weitgehend erhalten blieb, während die Transferaktivität verschwunden war (74). Auf Grund unserer heutigen Kenntnisse kann man ihr Ergebnis so deuten, daß die Spaltung im Anticodon erfolgte. Auch die Akzeptoraktivität von partiellen T1-RNase-Hydrolysaten aus $tRNA^{Ser}_{Hefe}$ (124) läßt sich heute auf die Aktivität von Fragmentkombinationen zurückführen. Die ersten definierten Fragmente aus einer gereinigten tRNA-Spezies wurden von Holley et al. beschrieben (11). Nach Partialspaltung von $tRNA^{Ala}_{Hefe}$ mit T1-RNase im Anticodon zeigte das Gemisch der Fragmente noch Akzeptoraktivität. Wurden die Hälften jedoch getrennt, so konnten sie nach dem Zusammengeben nicht mehr aminoacyliert werden (75). Im Gegensatz dazu fanden Bayev et al. (76), daß Hälften aus $tRNA^{Val}_{Hefe}$ nach Trennung und Rekombination wieder voll aminoacyliert werden konnten. Seit dieser Veröffentlichung wurden enzymatische Partialspaltungen an zahlreichen reinen tRNAs durchgeführt und die Fragmente durch Säulenchromatographie und Diskelektrophorese getrennt. Die Darstellung von tRNA-Fragmenten durch rein chemische Reaktionen ist bisher nur in wenigen Fällen gelungen. So ist es möglich $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ nach Abspaltung der Base Y neben dem Anticodon zu spalten (77). Weitere Möglichkeiten bieten die Spaltungen am 7-Methylguanosin (78) und am Dihydrouridin (79).

Fragmente aus verschiedenen tRNAs wurden bisher von Arbeitsgruppen in Rußland (80-85), Japan (86-91), USA (92-95), Frankreich (79) und von unserer Arbeitsgrup-

pe (78, 96, 97) für Untersuchungen über die Synthetaseerkennungsregion verwendet. Die im folgenden beschriebenen Versuche sollten dazu dienen, mehr Information über die Synthetaseerkennungsregion von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden Fragmente aus der genannten tRNA dargestellt und ihre Akzeptoraktivität allein und nach Kombination mit anderen Fragmenten untersucht. Die eigenen Ergebnisse werden zusammen mit denen anderer Arbeitsgruppen diskutiert.

2. Darstellung von Fragmenten aus $tRNA^{Phe}$ (HCl)

Da die Nucleotidsequenz von $tRNA^{Phe}$ aus Bäckerhefe bekannt ist (98), wurde sie bei der Bezeichnung der im folgenden beschriebenen Fragmente zugrunde gelegt (Abb. 7). Die Zählung beginnt am 5`-Ende der tRNA. Wenn nicht anders beschrieben, haben die Fragmente Phe 1-27, Phe 48-76 und Phe 21-76 keine endständige Phosphatgruppe, die Fragmente Phe 38-76 und Phe 38-65/66 eine Phosphatgruppe am 5`-Ende, die Fragmente Phe 34-74 und Phe 17-73 eine Phosphatgruppe am 3`-Ende und die Fragmente Phe 1-33, Phe 1-15, Phe 1-18 und Phe 1-74 jeweils eine Phosphatgruppe am 3`- und am 5`-Ende. Das Fragment Phe 1-36 trägt am 3`-Ende eine Phosphatgruppe plus modifizierter Ribose (99). Phe 38-65/66 bedeutet, daß ein Gemisch aus zwei Fragmenten, Phe 38-65 und Phe 38-66 vorliegt. In keinem der genannten Fragmente ist die Base Y enthalten. Alle Partialspaltungen wurden mit $tRNA^{Phe}$ (HCl) durchgeführt, weil die Fragmente bei der chromatographischen Trennung mit einem Puffer eluiert wurden, bei dessen pH-Wert (pH = 3) die Base Y abgespalten wird (128). Bei der Partialspaltung verhält sich $tRNA^{Phe}$ (HCl) wie die unmodifizierte $tRNA^{Phe}$.

In einigen Fällen wurde die Länge von Fragmenten, die nicht durch Totalspaltung mit T1-RNase analysiert wurden, auf Grund ihrer R_B-Werte (Methoden 3.19.) abgeschätzt. Da der R_B-Wert eines Oligonucleotids eine lineare Funktion des Logarithmus seiner Nucleotidzahl ist (125), ist auf diese Weise eine Längenbestimmung möglich, die mit einem Fehler von etwa 5 % behaftet sein kann. So

bedeutet z. B. die Bezeichnung 33N, daß dieses Fragment auf Grund seines R_B-Wertes 33 ± 2 Nucleotide lang ist.

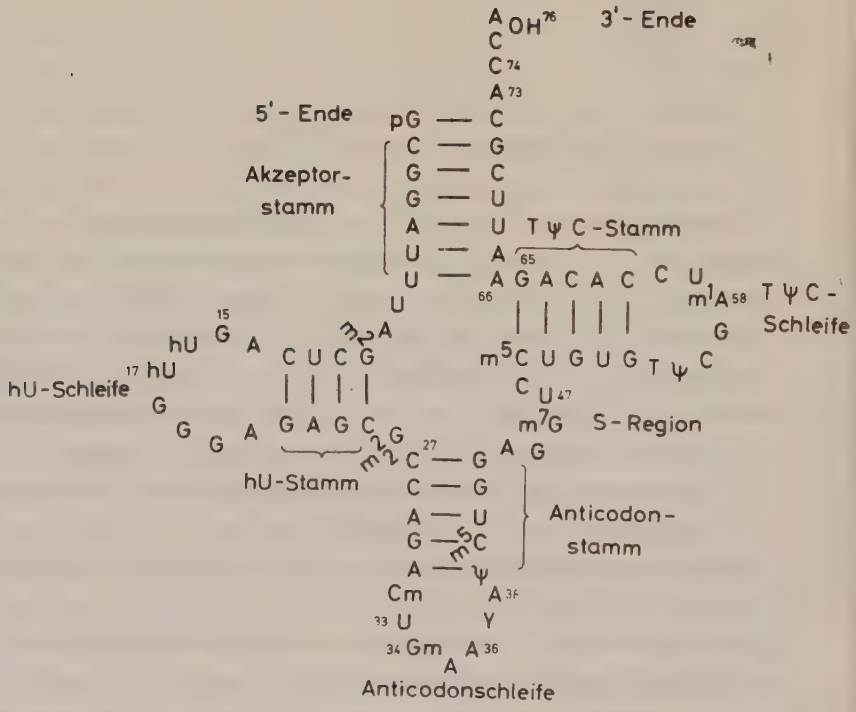

Abbildung 7: Kleeblattmodell der $tRNA^{Phe}$ aus Bäckerhefe nach RajBhandary et al. (98).

Die endständigen Nucleotide der Fragmente sind durch Zahlen gekennzeichnet.

2.1 Spaltung mit Endonucleasen

2.1.1 Partialspaltung mit Pankreas-RNase

Die Partialspaltung von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ mit Pankreas-RNase wurde bereits von Chang und RajBhandary beschrieben (101). Sie erhielten durch Spaltung neben dem Anticodon eine pG-Hälfte (Phe 1-33) und zwei CCA-Hälften (Phe 34-73), eine mit der Base Y und eine ohne Y. Bei beiden CCA-Hälften war das CpA am 3`-Ende abgespalten. Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde $tRNA^{Phe}$ (HCl) eingesetzt und die Inkubationsbedingungen gegenüber denen von Chang et al. etwas verändert.

In einigen Vorversuchen unter Anwendung der Diskelektrophorese wurden zunächst die optimalen Bedingungen für die Partialspaltung untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Ausbeute der Hälften am größten ist, wenn die in der Legende zu Abb. 8a angeführten Bedingungen eingehalten wurden. Die Reaktion wurde durch wiederholte Behandlung mit Macaloid gestoppt. Bei längerer Inkubation (100 Min.) wurden bis zu 95 % der $tRNA^{Phe}$ (HCl) unter Bildung von Hälften gespalten. Abb. 8b zeigt die relative Zunahme von Phe 1-33 und die Abnahme der ganzen tRNA. Die Ausbeute an Fragment Phe 34-74 steigt in der gleichen Weise wie die von Phe 1-33 an.

Um die Fragmente im präparativen Maßstab zu isolieren, wurden 650 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$ (HCl) wie in Legende zu Abb. 9a beschrieben mit Pankreas-RNase gespalten. Nach Stoppen der Reaktion durch Macaloid wurde das Gemisch aus Hälften und ganzer tRNA mit Alkohol gefällt und der gelöste Niederschlag über eine Whatman DE 23-Cellulose-Säule chromatographiert (Abb. 9a). Die Zuordnung der einzelnen Gipfel erfolgte durch Vergleich mit dem Elutionsprofil von Chang und RajBhandary (101). Außerdem wurden die in den Gipfeln enthaltenen Fragmente mit den bereits bekannten Hälften aus der Anilinspaltung (77) kombiniert und die Akzeptoraktivität bestimmt. So wurde Phe 34-74 dadurch charakterisiert, daß es nur nach Kombination mit Phe 1-36 Aminosäure akzeptierte, während

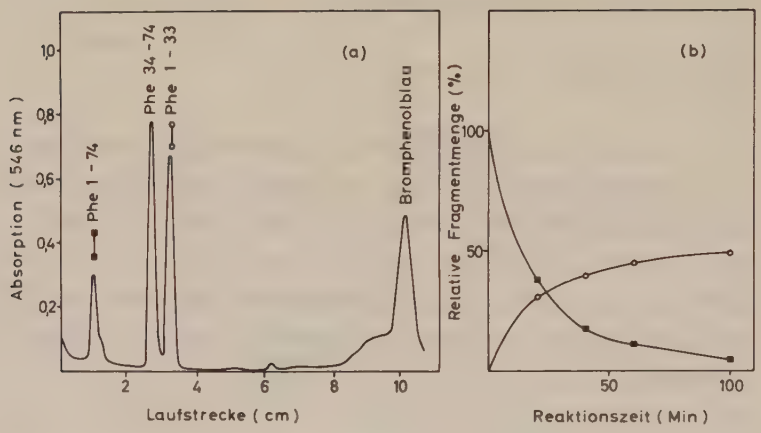

Abbildung 8: Partialspaltung von $tRNA^{Phe}$ (HCl) mit Pankreas-RNase

a) Densitogramm des Spaltmusters nach 60 Min. Inkubation. 5 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$ (HCl) wurden in 50 µl 0,1 M TRIS-HCl pH = 7,5, 0,01 M $MgCl_2$, 0,2 M KCl mit 10 µg Pankreas-RNase bei 0°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und jeweils 0,1 A_{260}-Einheiten auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

b) Zeitlicher Verlauf der Partialspaltung. In verschiedenen Densitogrammen wurden die Flächen unter den Gipfel bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Fläche unter dem Gipfel des Ausgangsproduktes im Densitogramm eines vor dem Start der Reaktion entnommenen Aliquots wurde gleich 100 % gesetzt. Inkubationsbedingungen und Symbole entsprechen denen von Abb. 8a.

Phe 1-33 nur in Kombination mit Phe 38-76 aminoacyliert wurde. Da Phe 34-74 nur dann mit Phenylalanin beladen werden konnte, wenn es vorher dephosphoryliert wurde und wenn das Inkubationsgemisch außer dem komplementären Fragment Phe 1-36 noch CTP und CCA-Transferase enthielt, handelt es sich in Übereinstimmung mit Chang und RajBhandary um eine CCA-Hälfte ohne CpA am 3`-Ende. Das Fragment Phe 1-74 entsteht offensichtlich aus $tRNA^{Phe}$ (HCl) durch Abspaltung des Dinucleotids CpA ohne gleichzeitige Spaltung im Anticodon, denn es ließ sich nur nach vorheriger Dephosphorylierung und in Gegenwart von CTP und CCA-

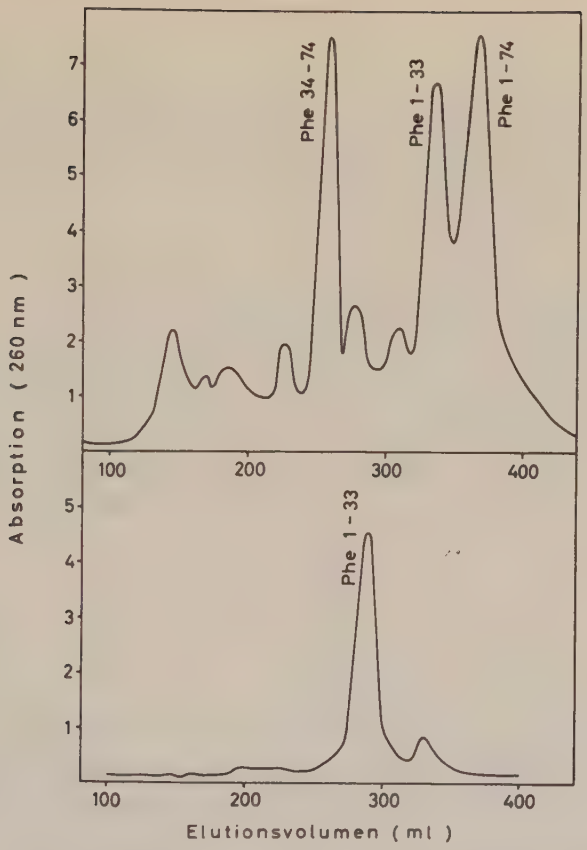

Abbildung 9: Partialspaltung von $tRNA^{Phe}$ (HCl) mit Pankreas-RNase.

650 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$ (HCl) wurden mit 130 µg Pankreas-RNase in 6,5 ml 0,1 M TRIS-HCl pH = 7,5, 0,01 M Magnesiumacetat, 0,1 M KCl 60 Min. bei 0°C gespalten.

a) Chromatographie des Oligonucleotidgemisches an einer Whatman-DE23-Cellulose-Säule (1 x 200 cm). Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten 2 x 400 ml 0,2 M NaCl und 0,45 M NaCl in 7 M Harnstoff pH = 3,0

b) Rechromatographie von Fragment Phe 1-33 (Fraktionen von 320-345 ml) aus Abb. 9a an einer Whatman-DE23-Cellulose-Säule (0,8 x 150 cm). Die Elution erfolgte mit 2 x 400 ml 0,2 M NaCl und 0,35 M NaCl in 7 M Harnstoff pH = 3,0

Transferase aminoacylieren. Die CCA-Hälfte war nach der ersten Säule bereits diskelektrophoretisch rein. Die pG-Hälfte mußte jedoch stets durch Rechromatographie (Abb. 9b) oder durch präparative Diskelektrophorese gereinigt werden, um geringe Mengen Phe 1-74 abzutrennen.

Aus 650 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$(HCl) wurden nach allen Reinigungs- und Aufarbeitungsprozeduren etwa 100-120 A_{260}-Einheiten CCA-Hälfte und 80-100 A_{260}-Einheiten pG-Hälfte erhalten. Im Gegensatz zu den Vorversuchen im analytischen Maßstab ist es mir nicht gelungen, bei einer Pankreas-RNase-Behandlung im präparativen Maßstab mehr als 50 % der $tRNA^{Phe}$(HCl) zu spalten. In einem Versuch wurde 150 Min. mit dem Enzym inkubiert. Nach der Chromatographie auf Whatman DE 23-Cellulose zeigte sich jedoch, daß sehr viele andere Bruchstücke entstanden waren.

2.1.2 Partialspaltung mit T2-RNase

Im Unterschied zur T1-RNase besitzt T2-RNase keine ausgesprochene Basenspezifität, sondern kann praktisch alle Phosphodiesterbindungen in einer RNA spalten (102). Wie bei anderen Endonucleasen kann man jedoch auch bei T2-RNase Bedingungen wählen, unter denen nur eine Partialspaltung erfolgt und größere tRNA-Fragmente entstehen.

Die Partialspaltung von $tRNA^{Phe}$(HCl) mit T2-RNase wurde zunächst im analytischen Maßstab unter Benutzung der Diskelektrophorese untersucht. In Abb. 10a ist ein typisches Spaltmuster dargestellt. Außer ungespaltener $tRNA^{Phe}$(HCl) und den analysierten Fragmenten Phe 1-15 und Phe 17-73 entstanden noch tRNA-Hälften und ein etwa 18 Nucleotide langes Fragment. Die Längenbestimmung der zuletzt genannten Bruchstücke erfolgte auf Grund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im analytischen Gel. Bei den Hälften muß es sich um ein Gemisch von Fragmenten handeln, denn auf gut trennenden Gelen wurden mindestens zwei Banden in diesem Bereich beobachtet. Da die tRNA-Hälften durch eine Anilinbehandlung, die

bei $tRNA^{Phe}$(HCl) eine Spaltung im Anticodon zur Folge hat (77), nicht weiter abgebaut wurden, muß man annehmen, daß sie durch Spaltung der T2-RNase im Anticodon entstanden sind. Eine Aminoacylierung dieser Hälften allein oder nach Rekombination mit Phe 1-36 oder Phe 38-76 war jedoch nicht möglich. In Abb. 10b ist die Abnahme bzw. Zunahme der einzelnen Fragmente in Abhängigkeit von der Reaktionszeit graphisch dargestellt. Da die Hälften nicht analysiert wurden, ist keine genaue Interpretation des Spaltverlaufs möglich. Es läßt sich jedoch aussagen, daß alle in Abb. 10a gezeigten Gipfel bereits nach 2 Min. Inkubation auftreten. Das Verhältnis $\frac{\text{Phe 17-73}}{\text{Phe 1-15}}$ wird mit zunehmender Inkubationszeit kleiner, d. h. Fragment Phe 17-73 wird offenbar weiter abgebaut. Gleichzeitig ist zu beobachten, daß die Hälften und Fragment 18 N zunehmen.

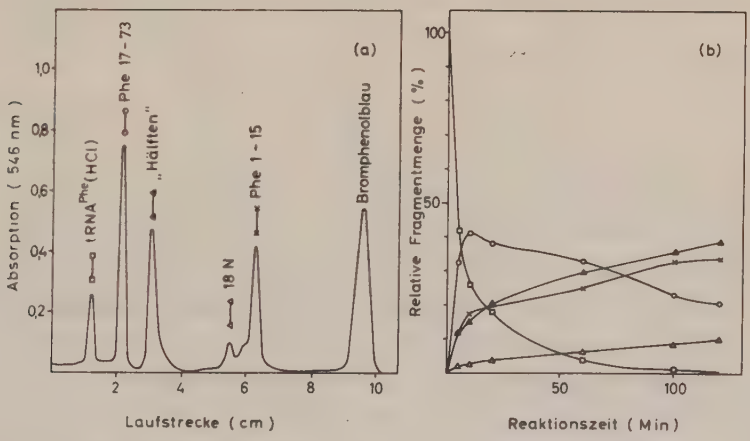

Abbildung 10: Partialspaltung von $tRNA^{Phe}$(HCl) mit T2-RNase

a) Densitogramm des Spaltmusters nach 60 Minuten Inkubation. 5 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$(HCl) wurden in 50 µl 0,2 M Kaliumacetat pH = 4,5, 0,02 M $MgCl_2$ mit 1 Einheit T2-RNase bei 0°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und jeweils 0,1 A_{260}-Einheiten auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

b) Zeitlicher Verlauf der Partialspaltung. Eine Serie von Densitogrammen wurde wie in Legende zu Abb. 8b beschrieben ausgewertet. Inkubationsbedingungen und Symbole entsprechen denen von Abb. 9a.

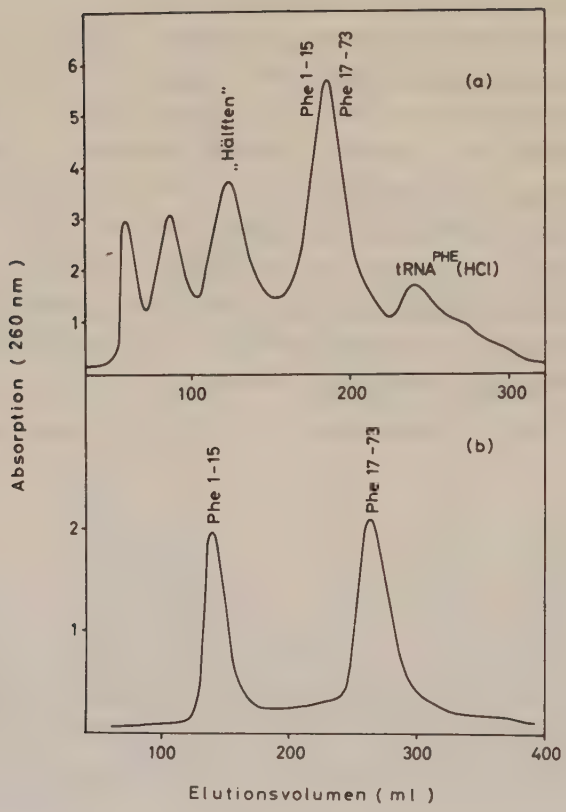

Abbildung 11: Partialspaltung von $tRNA^{Phe}$(HCl) mit T2-RNase

600 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$(HCl) wurden mit 120 Einheiten T2-RNase in 6 ml 0,2 M Kaliumacetat pH = 4,5, 0,02 M $MgCl_2$, 60 Min. bei 0°C gespalten.

a) Chromatographie des Oligonucleotidgemisches an einer DEAE-Sephadex A25-Säule (0,6 x 210 cm). Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten: 2 x 400 ml 0,2 M NaCl und 0,4 M NaCl in 7 M Harnstoff pH = 3,0

b) Rechromatographie von Fragmentgemisch Phe 1-15 + Phe 17-73 (Fraktionen von 160-210 ml) aus Abb. 11a. an einer Whatman-DE23-Cellulose-Säule (0,8 x 90 cm). Die Elution erfolgte mit 2 x 400 ml 0,25 M NaCl und 0,5 M NaCl, 0,02 M TRIS-HCl pH = 7,3, 7 M Harnstoff.

Um größere Mengen der genannten Fragmente zu erhalten, wurde der in Legende zu Abb. 10a beschriebene Reaktionsansatz um das 100- bis 150-fache vergrößert. Die Trennung der Fragmente erfolgte durch Chromatographie an DEAE-Sephadex A25 bei pH = 3. In Abb. 11a ist das Elutionsprofil dargestellt. Im ersten Gipfel sind vermutlich Mono- und Dinucleotide, da das Material nicht säurefällbar ist. Im zweiten Gipfel befindet sich Fragment N 18 und einige andere Oligonucleotide. Da Fragment Phe 1-15 auf dieser Säule nicht von Phe 17-73 abgetrennt werden konnte, wurde es an Whatman DE23-Cellulose bei pH = 7,3 rechromatographiert (Abb. 11b). Hier erfolgte eine sehr gute Trennung der beiden Fragmente. An Stelle von Whatman DE23-Cellulose kann auch DEAE-Cellulose von Serva benutzt werden. Nach der beschriebenen Chromatographie über zwei Säulen wurden aus 600 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$(HCl) etwa 110 A_{260}-Einheiten Phe 17-73 und 80 A_{260}-Einheiten Phe 1-15 erhalten.

2.2 Abbau von Fragmenten mit Exonuclease

Philippsen und Zachau (97) haben gezeigt, daß bestimmte Sequenzen einer tRNA ziemlich schnell, andere Bereiche der tRNA-Struktur nur sehr langsam mit Milz-Phosphodiesterase abgebaut werden. Sie nehmen an, daß seltene Nucleotide oder bestimmte basengepaarte Regionen der tRNA die Geschwindigkeit der Exonuclease verlangsamen, und es so zu einer Synchronisation des Abbaus kommt. Dieser Befund wurde dazu verwendet, aus $tRNA^{Ser}_{Hefe}$ und $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ durch partiellen Abbau mit Milz-Phosphodiesterase Fragmente zu isolieren. Andere Arbeiten aus unserem Labor (103) weisen darauf hin, daß Schlangengift-Phosphodiesterase sich ähnlich verhält, und es ebenfalls möglich ist, durch Abbau mit diesem Enzym aus einer tRNA Fragmente zu isolieren. Es hat sich gezeigt, daß auch größere Fragmente, die durch Partialspaltung mit Endonuclease oder durch chemische Spaltung entstehen, unter bestimmten Bedingungen mit Exonuclease zu kürzeren Fragmenten abgebaut werden können.

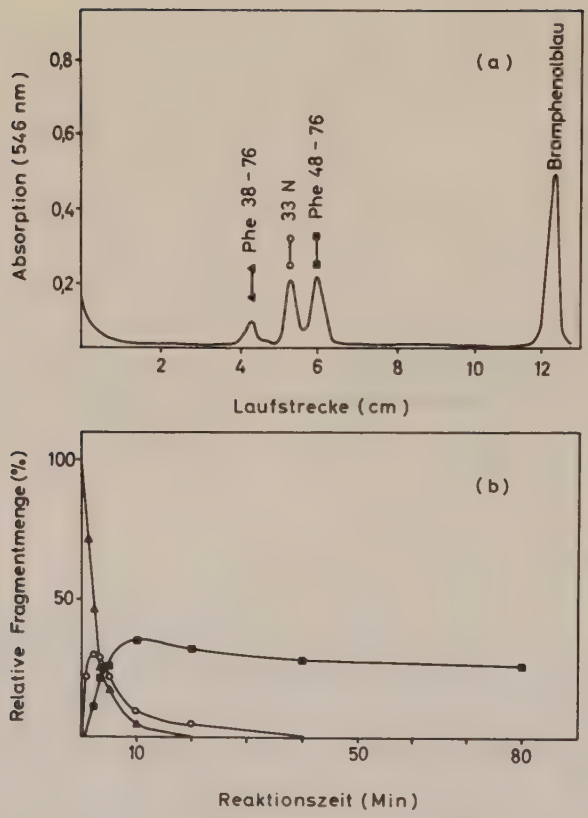

Abbildung 12: Abbau von Fragment Phe 38-76 mit Milz-Phosphodiesterase

a) Densitogramm des Abbaumusters nach 5 Min. Inkubation. 1,6 A_{260}-Einheiten Phe 38-76 (ohne endständige Phosphatgruppen) wurden in 210 µl 0,075 M Natriumphosphatpuffer pH = 6,0, 0,03 M Ammoniumsulfat mit 2,3 Einheiten Milz-Phosphodiesterase bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und jeweils 0,08 A_{260}-Einheiten auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

b) Zeitlicher Verlauf des Abbaus. Eine Serie von Densitogrammen wurde wie in Legende zu Abb. 8b beschrieben ausgewertet. Inkubationsbedingungen und Symbole entsprechen denen von Abb. 12a.

2.2.1 Abbau von Fragment Phe 38-76 mit Milz-Phosphodiesterase

Anilinbehandlung von $tRNA^{Phe}$(HCl) bei saurem pH-Wert führt zu einer Spaltung der tRNA neben dem Anticodon unter Bildung von zwei Hälften: Phe 1-36 und Phe 38-76 (77). Nach Abspaltung der endständigen Phosphatgruppe konnte die CGA-Hälfte (Phe 38-76) mit Milz-Phosphodiesterase abgebaut und auf diese Weise die zwei Fragmente Phe 48-76 und 33N erhalten werden. Ein typisches Spaltmuster, das man nach Elektrophorese eines Aliquots im Polyacrylamidgel erhält ist in Abb. 12a zu sehen. Die Abnahme bzw. Zunahme der einzelnen Fragmente in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ist in Abb. 12b graphisch dargestellt. Man sieht, daß sie CCA-Hälfte nach 15 Min. Inkubation vollständig abgebaut ist. Anschließend verschwindet Fragment 33 N, und es bleibt nur noch Phe 48-76 übrig, das auch nach 80 Min. vorhanden ist, also von der Milz-Phosphodiesterase nur langsam weiter abgebaut wird. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Densitogramme zeigt sich jedoch, daß der Verlauf der Reaktion nicht ganz so einfach ist, denn es treten noch weitere schwach ausgeprägte Gipfel auf, die sehr schnell wieder verschwinden. Fragment 33 N und Phe 48-76 hingegen sind besonders stabile Zwischenstufen, die daher auch aus einem präparativen Gel in ausreichender Menge isoliert werden konnten.

Um größere Mengen der neuen Fragmente zu erhalten, wurden 140 A_{260}-Einheiten Phe 38-76 (ohne endständige Phosphatgruppe) mit 200 Einheiten Milz-Phosphodiesterase bei 37°C in 18 ml 0,075 M Natriumphosphatpuffer pH = 6,0, 0,03 M Ammoniumsulfat 7 Min. inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Phenol gestoppt. Nach einer Alkoholfällung wurde das Fragmentgemisch auf einem 11 %-igen präparativen Acrylamidgel (Methoden 3.19.) getrennt. Wichtig ist, daß die Lösung vor Zugabe des Enzyms die angegebene Temperatur hat, andernfalls ist der zeitliche Verlauf des Abbaus nicht mit dem auf den analytischen Gelen beobachteten Ablauf identisch und die Ausbeute der einzelnen Fragmente anders als erwartet. Aus 140 A_{260}-Einheiten Phe 38-76 wurden nach Elution aus dem Gel und Reinigung über eine DEAE-Cellulose-Säule 15 A_{260}-Einheiten Phe 48-76 und 16 A_{260}-Einheiten 33 N erhalten. Das Fragment 33 N konnte nicht eindeutig analysiert werden, und seine Länge wurde daher auf Grund der Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel bestimmt.

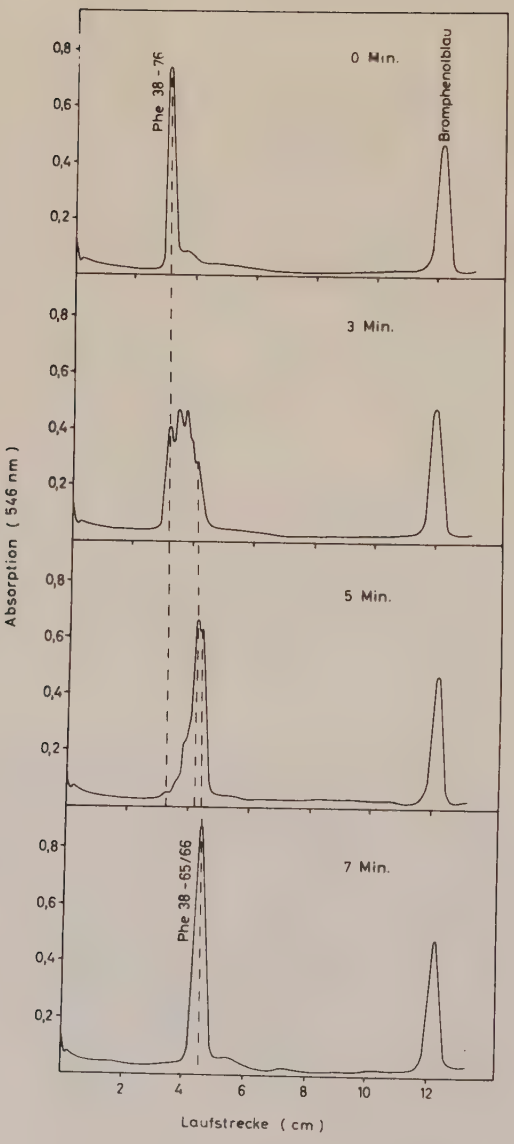

Abbildung 13a: Abbau von Fragment Phe 38-76 mit Schlangengift-Phosphodiesterase. 2,0 A_{260}-Einheiten Phe 38-76 wurden in 110 µl 0,1 M TRIS-HCl pH = 8,9, 0,01 M $MgCl_2$ mit 0,95 Einheiten Schlangengift-Phosphodiesterase bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und jeweils 0,1 A_{260}-Einheiten auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Neben dem Densitogramm des ungespaltenen Fragments Phe 38-76 sind Densitogramme der Abbaumuster nach 3, 7 und 10 Min. Inkubation abgebildet.

2. 2. 2 Abbau von Fragment Phe 38-76 mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Schlangengift-Phosphodiesterase baut RNA vom 3`-Ende her ab unter Bildung von 5`-Nucleotiden. Der Angriff des Enzyms auf das Fragment Phe 38-76 beginnt also am Akzeptorende, und man hat so die Möglichkeit, ein Fragment zu isolieren, das sich vom Anticodon zur T C-Region erstreckt. Der zeitliche Verlauf einer solchen Abbaureaktion wurde auf einem analytischen Gel verfolgt. Aus Abb. 13 läßt sich ersehen, daß das Fragment zunächst nicht-synchron abgebaut wird. Nach 7 Min. bleibt eine Bande übrig, die nur langsam verschwindet und auch nach 30 Min. noch vorhanden ist. Das Fragment in dieser Bande wurde im präparativen Maßstab isoliert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure (pH 4-5) und Phenolbehandlung gestoppt. Die Reinigung des entstandenen Fragments erfolgte durch Chromatographie über eine DEAE-Harnstoff-Säule (Abb. 14). Das isolierte Fragment war nach Diskelektrophorese rein, und die Oligonucleotidanalyse zeigte, daß es sich um das Fragment Phe 38-65/66 handelt. Aus 145 A_{260}-Einheiten des Ausgangsmaterials wurden 55 A_{260}-Einheiten Phe 38-65/66 erhalten.

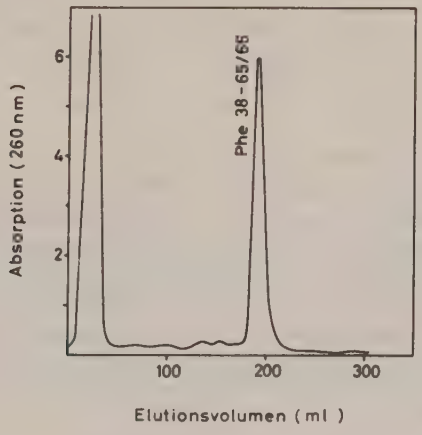

Abbildung 14: Chromatographie der Abbauprodukte von Fragment Phe 38-76 mit Schlangengift-Phosphodiesterase auf einer DEAE-Säule (0,8 x 25 cm)

145 A_{260}-Einheiten Phe 38-76 wurden in 8 ml 0,1 M TRIS-HCl pH = 8,9, 0,01 M $MgCl_2$ mit 74 Einheiten Schlangengift-Phosphodiesterase 12 Min. bei 37°C inkubiert. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten: 2 x 250 ml 0,05 M NaCl und 0,4 M NaCl in 7 M Harnstoff pH = 3,0.

2.2.3 Abbau von Fragment Phe 1-33 mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Bei der Partialspaltung von $tRNA^{Phe}$(HCl) mit Pankreas-RNase entstehen die Hälften Phe 1-33 und Phe 34-74 (vergleiche 2.1.1). Nach der Dephosphorylierung ließ sich Fragment Phe 1-33 mit Schlangengift-Phosphodiesterase zu kürzeren Fragmenten abbauen. Der zeitliche Verlauf dieser Reaktion wurde wiederum auf einem analytischen Gel untersucht. Abb. 15a zeigt ein typisches Spaltmuster und in Abb. 15b ist die Zu- bzw. Abnahme der einzelnen Fragmente in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Das Fragment 18 N scheint sehr stabil zu sein, da es noch nach 80 Min. (länger wurde nicht inkubiert) in guter Ausbeute vorhanden war. Da sich dieses Fragment hinsichtlich seiner Wanderungsgeschwindigkeit im Gel wie Fragment Phe 1-18 von R. Thiebe (aus Partialspaltung mit T1-RNase) verhielt, und man somit annehmen kann, daß es diesem sehr ähnlich ist, wurde es nicht isoliert. Für den Abbau im präparativen Maßstab wurden daher Bedingungen gewählt, bei denen das Fragment Phe 1-27 in guter Ausbeute auftrat. 90 A_{260}-Einheiten Phe 1-33 (ohne endständige Phosphatgruppen) wurden in 3,0 ml 0,1 M TRIS-HCl pH 8,9, 0,01 M $MgCl_2$ mit 50 Einheiten Schlangengift-Phosphodiesterase bei 37°C 12 Min. inkubiert. Nach Phenolisieren und Alkoholfällung wurde das Fragmentgemisch auf einem 11 %-igen präparativen Polyacrylamidgel getrennt. Nach Elution aus dem Gel und Chromatographie über eine DEAE-Cellulose-Säule betrug die Ausbeute an Fragment Phe 1-27 etwa 10 A_{260}-Einheiten.

Es wurde auch versucht, die pG-Hälfte aus der Anilinspaltung (Phe 1-36) mit Schlangengift-Phosphodiesterase unter den beschriebenen Bedingungen abzubauen. Es zeigte sich jedoch, daß die Reaktion wesentlich langsamer verläuft, und die Fragmente Phe 1-27 bzw. 18 N nur schwach auftreten. Die Vermutung liegt nahe, daß die endständige modifizierte Ribose (99) den Angriff der Exonuclease erschwert. Hat das Enzym einmal dieses "Hindernis" überwunden, so erfolgt der weitere Abbau sehr rasch.

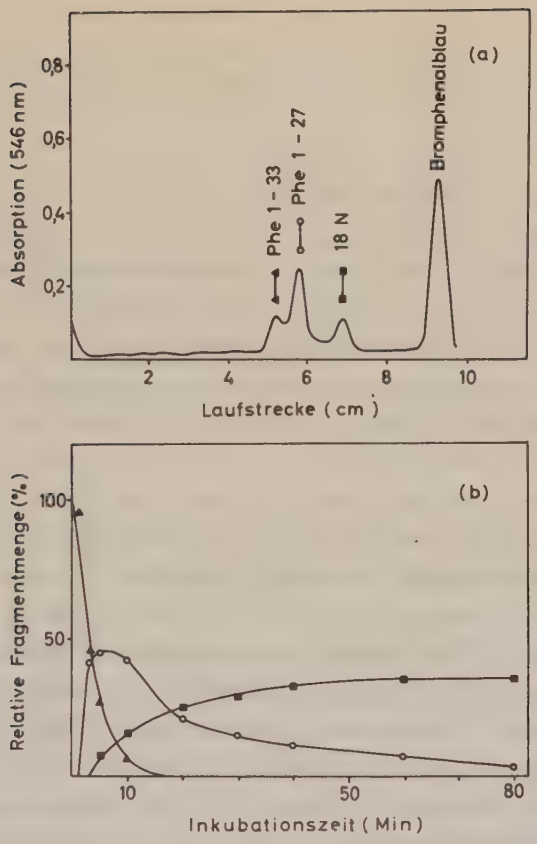

Abbildung 15: Abbau von Fragment Phe 1-33 mit Schlangengift-Phosphodiesterase

a) Densitogramm des Abbaumusters nach 10 Min. Inkubation. 1,8 A_{260}-Einheiten Phe 1-33 (ohne endständige Phosphatgruppen) wurden mit 0,95 Einheiten Schlangengift-Phosphodiesterase bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und jeweils 0,1 A_{260}-Einheiten auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

b) Zeitlicher Verlauf des Abbaus. Eine Serie von Densitogrammen wurde wie in Legende zu Abb. 8b beschrieben ausgewertet. Inkubationsbedingungen und Symbole entsprechen denen von Abb. 15a.

3. Oligonucleotidanalysen der isolierten Fragmente

3.1 Analyse von Fragment Phe 17-73

Fragment Phe 17-73 wurde vor der T1-RNase-Totalspaltung mit radioaktivem Natriumborhydrid reduziert. Da bei der Umsetzung von $tRNA^{Phe}$ (HCl) mit $NaBH_4$ unter den angegebenen Bedingungen (Methoden 3.13) nur hU und die freie Ribose in Position 37 reduziert werden (104), ist so der Nachweis von hU bzw. hU-haltigen Oligonucleotiden erleichtert. Das Elutionsdiagramm von Phe 17-73 nach Spaltung mit T1-RNase ist in Abb. 16b dargestellt. Ein Vergleich mit dem Elutionsdiagramm von $tRNA^{Phe}$(HCl) nach Spaltung mit T1-RNase (Abb. 16a) zeigt, daß unter anderem die Oligonucleotide C-A-C-C-A und hU-hU-Gp fehlen. Stattdessen wurden zwei neue Dinucleotide, C-Ap und hU^+-Gp gefunden. C-Ap wurde zusammen mit A-Gp von der Säule eluiert, ließ sich aber auf der Papierelektrophorese bei p_H = 3,5 abtrennen. Nach Abbau des neuen Dinucleotids mit Phosphomonoesterase und Schlangengift-Phosphodiesterase wurden die Nucleotide A und C im Verhältnis 1 : 1 durch Papierchromatographie in System A nachgewiesen. hU^+-Gp wurde zusammen mit U-Gp von der Säule eluiert und konnte auch nicht durch Papierelektrophorese getrennt werden. Aus den im folgenden beschriebenen Überlegungen wurde geschlossen, daß es sich um hU^+-Gp handelt. Da unter den angegebenen Bedingungen nur hU und die freie Ribose im Dodecanucleotid A-Cm-U-Gm-A-A-Rib-A-U-m^5C-U-Gp reduziert werden (104), muß man annehmen, daß zusammen mit U-Gp ein hU^+-haltiges Dinucleotid eluiert wurde. Auf Grund der bekannten Sequenz von $tRNA^{Phe}$ (98), muß es sich dabei um hU^+-Gp handeln. Dieser Befund steht in Einklang mit der quantitativen Auswertung, nach der unter dem radioaktiven Gipfel U-Gp und Gp im Molverhältnis 1 : 1 vorhanden sein könnten. hU^+ kann bei dieser Betrachtung vernachlässigt werden, da es nicht bei 260 nm absorbiert.

3.2 Analyse von Fragment Phe 1-15

Das Elutionsdiagramm von Fragment Phe 1-15 nach Totalspaltung mit T1-RNase ist in Abb. 16c dargestellt. Das Fragment wurde vor der enzymatischen Spaltung mit radioaktivem Natriumborhydrid reduziert. Die Oligonucleotide wurden durch R_{Up}-Werte und Spektren charakterisiert. Aus Tabelle 2 ist zu ersehen, daß alle auftretenden Oligonucleotide bereits aus der Totalspaltung von ganzer $tRNA^{Phe}$ bekannt sind. Da in keiner der Fraktionen erhöhte Radioaktivität gefunden wurde, kann man auch ausschließen, daß hU in dem Fragment enthalten ist.

3.3 Analyse von Fragment Phe 48-76

Das Elutionsdiagramm von Fragment Phe 48-76 nach Totalspaltung mit T1-RNase ist in Abb. 16d dargestellt, die dazugehörigen Analysendaten sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Neben den bereits aus $tRNA^{Phe}$ bekannten Oligonucleotiden trat C-m^5C-U-Gp neu auf. Es wurde zusammen mit T-ψ-C-Gp von der DEAE-Cellulose-Säule eluiert, konnte aber durch Papierelektrophorese bei p_H = 2,7 abgetrennt werden. Das neue Oligonucleotid wurde mit Phosphomonoesterase und Schlangengift-Phosphodiesterase abgebaut und die entstehenden Nucleotide durch Papierchromatographie in System A getrennt. Durch Vergleich mit Referenzsubstanzen, und auf Grund der Spektren wurden die Nucleoside U, C und G nachgewiesen. Da System A keine gute Trennung von C und m^5C erlaubt, wurde das wie C wandernde Nucleosid auf einer Cellulosedünnschichtplatte in System B chromatographiert. Es fand eine Auftrennung in zwei Nucleoside statt, die wie C bzw. m^5C wanderten. Auf Grund dieser Nucleotidzusammensetzung und der Tatsache, daß es von der Säule zusammen mit einem Tetranucleotid eluiert wird, muß es sich um C-m^5C-U-Gp handeln. Für das neue Nucleotid wurde ein Extinktionswert von $E_{260} \times 10^{-3} = 31$ angenommen. Dieser Wert läßt sich aus den von RajBhandary angegebenen Werten (105) abschätzen.

Tabelle 2: Tabelle 2: Elektrophoretische Beweglichkeiten und molare Mengen der Oligonucleotide aus Hydrolysaten der Fragmente mit T1-RNase.
Die Papierelektrophorese wurde, wenn nicht anders angegeben, bei pH=2,7 durchgeführt und die Beweglichkeit relativ zu 3`-UMP bestimmt (R_{Up}-Werte). Die Menge an T-ψ-C-Gp wurde willkürlich gleich 1 Mol gesetzt, nur bei Phe 1-15 und Phe 1-27 wurde die Menge an C-U-C-A-Gp als Referenz benutzt. Die ε-Werte wurden von RajBhandary et al. (105) übernommen bzw. aus den dort angegebenen Werten abgeschätzt.

		Molare Mengen der Spaltprodukte					
Oligonucleotid	R_{Up}	$tRNA^{Phe}$(HCl)	Phe 17-73	Phe 1-15	Phe 48-76	Phe 38-65/66	Phe 1-27
C-m_2^2G>p	0,51	0,95	0,85				0,95
Gp	0,55	3,7	3,0	1,1		1,1	3,95
C-A-C-C	-0,13	0,2			0,45		
U-Gp	1,04	1,1	1,5		1,0		
hU^+-Gp	1,04					1,15	
C-Gp	0,54	1,2		1,0			1,0
A-Gp	0,56*)	3,1	3,75			1,1	2,25
C-Ap	0,42*)						
C-A-C-C-A	-0,07	0,75			0,60		
hU-hU-Gp	1,1	1,0					1,1
pGp	1,06	0,95		0,9			
T-ψ-C-Gp	1,05	1,0	1,0		2,1	1,0	
C-m^5C-U-Gp	0,73						
C-C-A-Gp	0,42	0,9	0,9				
C-U-C-A-Gp	0,49	0,95		1,0			1,0
m^7G-U-C-m^5C-U-Gp	0,77	0,95	0,95			0,95	
A-U-U-U-A-m^2G>p	1,02	0,95		1,0			1,0
A-A-U-U-C-Gp	0,84	0,9	0,95		1,05		
m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp	0,90	0,9	0,95		1,05	0,65	
A-Cm-U-Gm-A-A-Rib^+-A-ψ-m^5C-U-Gp		0,85	0,95				
m^1A-U-C-C-A-C-A-G	0,34					0,35	
pA-ψ-m^5C-U-Gp	1,15					0,95	

*) Papierelektrophorese bei pH = 3,5

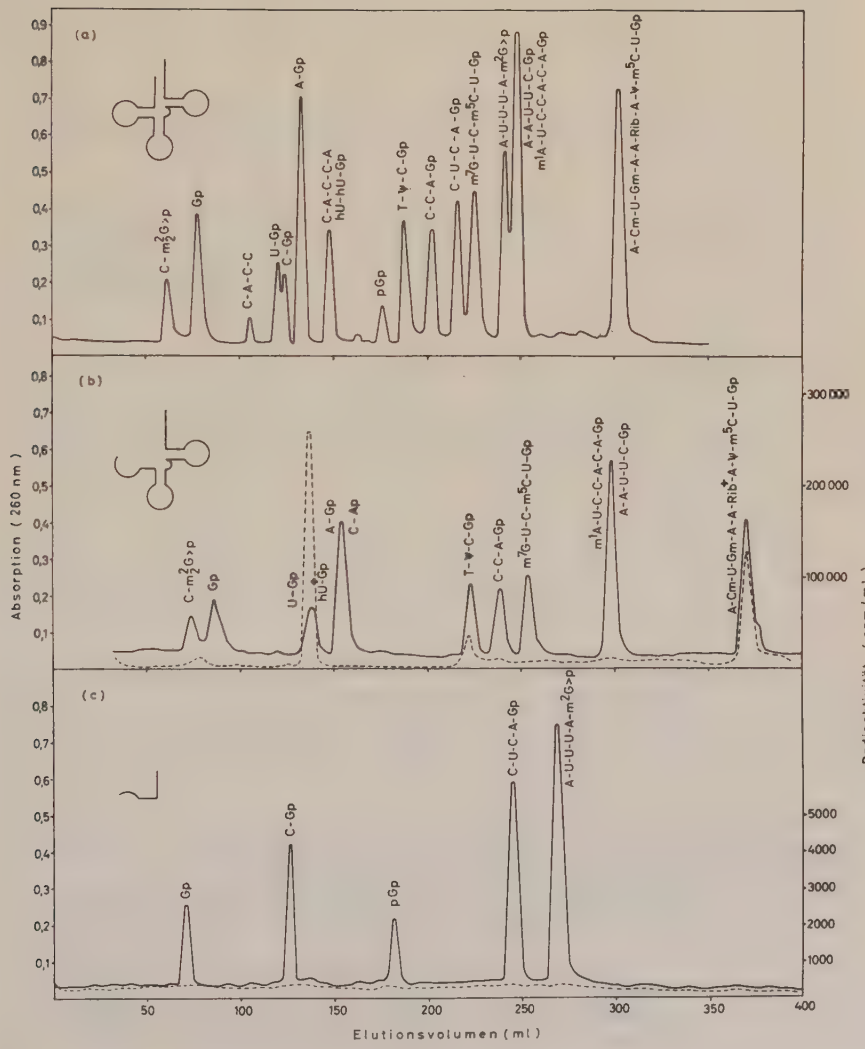

Abbildung 16

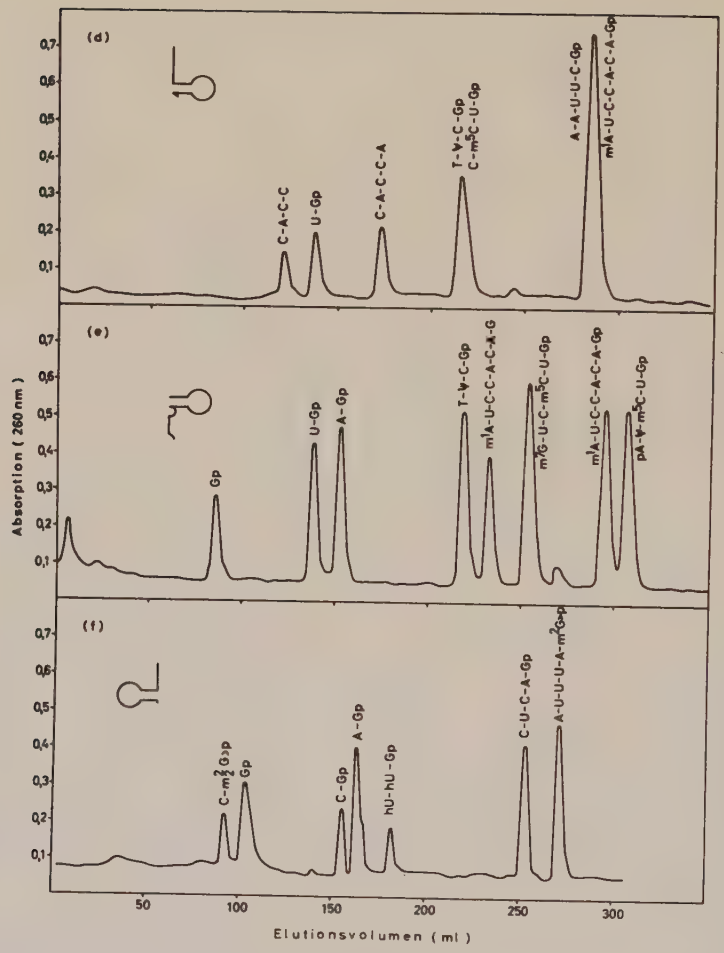

Abbildung 16: Elutionsprofile der Hydrolysate von $tRNA^{Phe}$(HCl) und von Fragmenten nach Totalspaltung mit T1-RNase.

Die jeweils eingesetzten A_{260}-Einheiten sind in Klammern angegeben.

a) $tRNA^{Phe}$(HCl)	[17]	d) Phe 48-76	[10]
b) Phe 17-73	[15]	e) Phe 38-65/66	[10]
c) Phe 1-15	[10]	f) Phe 1-27	[8]

3.4 Analyse von Fragment Phe 38-65/66

Fragment Phe 38-65/66 wurde mit T1-RNase vollständig gespalten und das Oligonucleotidgemisch chromatographiert. In Abb. 16e ist das Elutionsprofil dargestellt, Tabelle 2 gibt die Analysenwerte für die einzelnen Oligonucleotide an. Da das Fragment aus Phe 38-76 gewonnen wurde, entstand das Oligonucleotid pA-Ψ-m^5C-U-Gp bei der Spaltung mit T1-RNase. Das neue Oligonucleotid m^1A-U-C-C-A-C-A-G wurde wie folgt charakterisiert:

a) Phosphomonoesterasebehandlung von m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp (R_{Up} = 0,5) führte zu einem Produkt mit dem R_{Up}-Wert 0,34, der dem R_{Up}-Wert des neuen Oligonucleotids entspricht.

b) beim vollständigen Abbau mit Milz-Phosphodiesterase und anschließender Elektrophorese entstanden dieselben 3`Mononucleotide wie aus m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp, jedoch wurde an Stelle von Gp das Nucleosid G gefunden, das durch Spektrum und Vergleich mit einer Referenzsubstanz nachgewiesen wurde.

Das isolierte Fragment ist also nicht einheitlich, sondern ein Gemisch aus etwa 40 % Fragment Phe 38-65 und 60 % Fragment Phe 38-66.

Nucleosid 66 konnte nicht nachgewiesen werden. Es muß aber vorhanden sein, da beim Abbau mit Schlangengift-Phosphodiesterase eine 3`-OH-Gruppe entstehen muß, das Oligonucleotid $m^1$A-U-C-C-A-C-Gp also nicht das 3`Ende des Fragments sein kann. Man muß daher annehmen, daß mindestens noch das A aus Position 66 vorhanden ist. Bei der Spaltung mit T1-RNase wird A als Nucleosid frei, das bei der Chromatographie auf DEAE-Cellulose nicht adsorbiert wird, und daher unter den UV-absorbierenden Verunreinigungen, die häufig in den ersten Fraktionen zu finden sind, nicht nachgewiesen werden kann. Andererseits sollte ApA ähnlich wie ein Mononucleotid laufen und daher nachzuweisen sein.

3.5 Analyse von Fragment Phe 1-27

Bei der Analyse von Fragment Phe 1-27 traten die gleichen Schwierigkeiten auf wie bei Fragment Phe 38-65/66. In Abb. 16f ist das Elutionsprofil nach Spaltung mit T1-RNase dargestellt. Die Oligonucleotide wurden durch R_{Up}-Werte und Spektren charakterisiert (Tabelle 2). Alle auftretenden Oligonucleotide sind bereits aus der Spaltung von $tRNA^{Phe}$ bekannt. Es muß auch hier wieder mindestens ein Nucleosid (C in Position 27) nicht adsorbiert worden sein, denn $C\text{-}m_2^2 G > p$ kann aus den bereits beschriebenen Gründen nicht das 3`-Ende des Fragments sein. Es sei darauf hingewiesen, daß das Fragment Phe 1-33 vor dem Abbau mit Schlangengift-Phosphodiesterase dephosphoryliert wurde, und daher im Elutionsprofil kein pGp auftritt.

4. Akzeptoraktivität von Fragmenten und Fragmentkombinationen für Phenylalanin

Bayev et al. beschrieben 1967, daß ein äquimolares Gemisch von Hälften aus $tRNA^{Val}_{Hefe}$ die gleiche Akzeptoraktivität hat wie die ungespaltene tRNA (76). Spätere Veröffentlichungen aus der gleichen (80-85) und aus anderen Arbeitsgruppen (78, 86-96) zeigten jedoch, daß im allgemeinen kombinierte Fragmente nie die volle Akzeptoraktivität der ungespaltenen tRNA erreichen. In einigen Fällen (87, 92, 93) konnten auch Hinweise darauf erhalten werden, daß das Ausmaß der Aminoacylierung von den Inkubationsbedingungen abhängig ist. Man muß annehmen, daß der Aminoacylierung eine Reassoziation der Fragmente vorangeht, die abhängig ist von der Zeit, der Temperatur, den Salzbedingungen, dem p_H-Wert u.a.m. Es wurde daher versucht, optimale Bedingungen für die Beladung von $tRNA^{Phe}$-Fragmenten mit Aminosäure zu finden. Die Akzeptoraktivität einer Fragmentkombination wurde mit der von $tRNA^{Phe}$(HCl) verglichen und 1200 pMol Phe/A_{260}-Einheit gleich 100 % Akzeptoraktivität gesetzt.

4.1 Untersuchungen über die Aminoacylierungsbedingungen von Fragmenten aus $tRNA^{Phe}$

Die Bestimmung der Akzeptoraktivität erfolgte in der Weise, daß die Fragmente vor Zugabe von Aminosäure und Synthetase präinkubiert wurden. Es wird zunächst

der Einfluß der Präinkubation auf die Renaturierung beschrieben.

Einfluß von p_H-Wert und Salzbedingungen

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß für die angegebenen Fragmentkombinationen eine Präinkubation in 10 mM TRIS-Puffer p_H=7,5, 4 mM $MgCl_2$ am günstigsten ist. 8 mM $MgCl_2$ an Stelle von 4 mM ergab keinen Unterschied. Wurden die Fragmentlösungen ohne Zusatz von Salzen präinkubiert, so war die Höhe des Einbaus Schwankungen unterworfen, die vermutlich daher kamen, daß die wässrigen Fragmentlösungen bereits Salze enthielten, deren Konzentrationen jedoch sehr unterschiedlich waren. Es gab keine großen Unterschiede bei den zwei verwendeten pH-Werten. Es sieht jedoch so aus, als wenn p_H = 7,5 günstiger ist als p_H = 6,5.

Tabelle 3: Abhängigkeit der Akzeptoraktivität von Fragmentkombinationen vom p_H-Wert und von den Salzbedingungen bei der Präinkubation.
Die Akzeptoraktivität wurde wie beschrieben (Methoden 3.17.) bestimmt, jedoch erfolgte die Präinkubation in jeweils 50 µl des in der Tabelle angegebenen Puffers.

		Akzeptoraktivität (%)	
		Phe1-18 + Phe21-76	Phe1-33 + Phe38-76
10 mM TRIS-Acetat	p_H = 6,5	43	17
30 mM NH_4Cl	p_H = 7,5	50	17
10 mM TRIS-Acetat	p_H = 6,5	56	18
4 mM $MgCl_2$	p_H = 7,5	60	20
10 mM TRIS-Acetat	p_H = 6,5	39	14
2 mM EDTA	p_H = 7,5	39	15
150 mM KCl 5 mM $MgCl_2$ 0,5 mM EDTA 10 mM Cacodylsäure	p_H = 7,0	35	13

Der Einfluß von Zeit und Temperatur wurde von Oda et al. (87) bei der Renaturierung von Fragmenten aus $tRNA^{Val}_{E.\,coli}$ untersucht. Sie zeigten, daß kurzes Erhitzen auf hohe Temperatur ($65^{o}C$-$85^{o}C$) und anschließend langsames Abkühlen oder 20 Std. Präinkubation bei $37^{o}C$ für eine optimale Beladung erforderlich sind. Im Falle der Fragmente aus $tRNA^{Phe}$ zeigte sich jedoch, daß 60 - 90 Min. Vorinkubation bei $37^{o}C$ für eine optimale Beladung ausreicht. Kürzere Inkubationszeiten führten zu niedrigeren Werten, längere Inkubation (bis zu 300 Min.) ergab keine Zunahme der Akzeptoraktivität. Kurzes Erhitzen auf $65^{o}C$ (2 Min.) und anschließend 90 Min. Tempern bei $37^{o}C$ führte ebenfalls zu keiner Zunahme. Erfolgte die Zugabe von Enzym sofort nach kurzem Erhitzen auf $65^{o}C$ ohne Vorinkubation bei $37^{o}C$ (Probe wurde von $65^{o}C$ rasch auf $20^{o}C$ abgekühlt), so war die Akzeptoraktivität der Kombination Phe 1-18 + Phe 21-76 praktisch gleich Null, im Falle der Kombination Phe 1-36 + Phe 38-76 wurde dagegen normale Aminoacylierung beobachtet. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis darauf, daß für verschiedene Fragmentkombinationen auch die optimalen Bedingungen unterschiedlich sind.

Tabelle 4: Abhängigkeit der Akzeptoraktivität von der Menge an Phenylalanyl-tRNA-Synthetase.

Die Bestimmung der Akzeptoraktivität erfolgte wie beschrieben (Methoden 3.17.), jedoch wurde 15 Min. bei $37^{o}C$ in 50 µl 150 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA und 10 mM Cacodylsäure pH = 7,0 präinkubiert. Die Aktivitätseinheiten der zugesetzten Synthetase wurden wie beschrieben (106) bestimmt. Die Werte in Klammern wurden ohne Zusatz von Fremdprotein erhalten.

	Akzeptoraktivität (%)							
	40 µE		80 µE		160 µE		240 µE	
$tRNA^{Phe}$ (HCl)			96	[68]			97	[90]
Phe 1-36 + Phe 38-76	33	[5]	48	[26]	48	[45]	45	
Phe 1-15 + Phe 21-76	10	[5]	21	[6]	21	[18]	19	

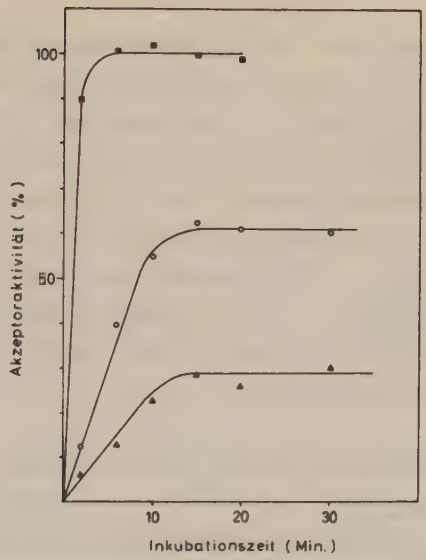

Abbildung 17: Abhängigkeit der Akzeptoraktivität von der Inkubationszeit. 0,04 - 0,08 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$ (HCl) oder äquimolare Mengen der angegebenen Fragmente wurden unter Standardinkubationsbedingungen für verschieden lange Zeiten in Gegenwart der Synthetase inkubiert.

▲——▲ Phe 1-33 + Phe 38-76

■——■ $tRNA^{Phe}$(HCl)

O——O Phe 1-18 + Phe 21-76

100 % = 1200 pMol Phe/A_{260}-Einheit $tRNA^{Phe}$(HCl)

Bei der Hauptinkubation d. h. Inkubation in Gegenwart von Aminoacyl-tRNA-Synthetase und Aminosäure wurde zunächst die Abhängigkeit von der zugesetzten Enzymmenge untersucht (Tabelle 4). Ein Zusatz von Fremdprotein - in diesem Falle nucleasefreie Aldolase - ist bei geringen Enzymmengen offensichtlich erforderlich, um eine Inaktivierung der Synthetase zu verhindern. Eine Erhöhung der Enzymmenge über den für optimale Beladung erforderlichen Wert (80 - 100 µE) hinaus, ergab bei weniger reinen Synthetasepräparaten ein Absinken der Akzeptoraktivität. Dies ist vermutlich auf die Anwesenheit von Nucleasen zurückzuführen.

Bei der Untersuchung der Zeit- und Temperaturabhängigkeit zeigte es sich, daß der Plateauwert der Aminoacylierung für jede der untersuchten Fragmentkombination (Phe 1-36 + Phe 38-76, Phe 1-15 + Phe 21-76, Phe 1-36 + Phe 48-76) unabhängig davon ist, ob bei $0^{o}C$, $10^{o}C$, $20^{o}C$ oder $25^{o}C$ inkubiert wurde. In Abb. 17 wird die Zeitabhängigkeit der Beladung von zwei verschiedenen Fragmentkombinationen und $tRNA^{Phe}$(HCl) verglichen. Man sieht, daß das Plateau bei $tRNA^{Phe}$(HCl) schneller erreicht wird als bei den Fragmentkombinationen. Imura et al. (93) haben berichtet, daß einige ihrer Fragmentkombinationen aus $tRNA^{Ala\ II}_{Hefe}$ bei $0^{o}C$ besser einbauen als bei $25^{o}C$. Bei den Fragmenten aus $tRNA^{Phe}$ wurde jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Es war bereits früher beobachtet worden (68), daß die optimale Magnesiumkonzentration für die Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$(HCl) und Hälften aus $tRNA^{Phe}$(HCl) höher ist als die für $tRNA^{Phe}$. Untersuchungen an verschiedenen Fragmentkombinationen ergaben, daß die optimale Magnesiumkonzentration wie bei $tRNA^{Phe}$(HCl) bei 20-30 mM liegt. Bei höheren Mangnesiumkonzentrationen ist das Ausmaß der Aminoacylierung herabgesetzt.

Die Ergebnisse der beschriebenen Experimente zeigen, daß Fragmentkombinationen aus $tRNA^{Phe}$ offenbar nie zu 100 % aminoacylierbar sind. Auf Grund der Versuchsergebnisse ist kaum anzunehmen, daß ein Gleichgewicht nur zwischen den einzelnen Fragmenten und einem aminoacylierbaren Komplex vorliegt, denn dann sollte bei Inkubation über längere Zeiten ein Anstieg in der Akzeptoraktivität zu beobachten sein. Man muß vielmehr erwarten, daß die Verhältnisse komplizierter sind, und z. B. ein Gleichgewicht vorliegt wie es in Abb. 18 schematisch dargestellt ist. Inkompetente d. h. zur Komplexbildung nicht befähigte Fragmente müssen erst in kompetente Fragmente übergeführt werden, die dann zur Bildung von aktiven d. h. aminoacylierbaren und inaktiven Komplexen fähig sind. Fragmentkomplexe können z. B. deshalb inaktiv sein, weil durch "falsche" Basenpaarungen bei der Ausbildung der zwei- und dreidimensionalen Struktur ein Molekül entstanden ist, das nicht von der Synthetase erkannt wird.

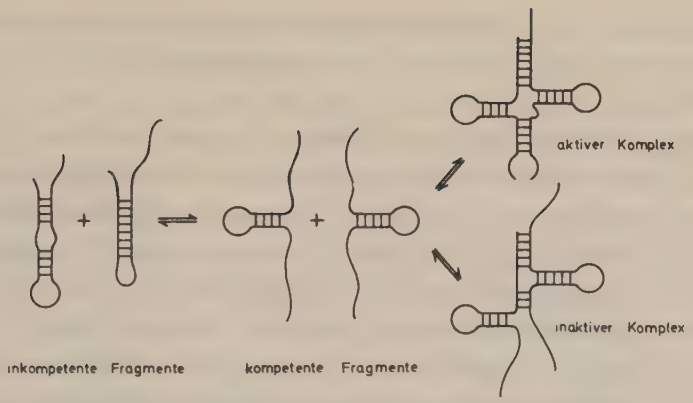

Abbildung 18: Schematische Darstellung der Komplexbildung aus tRNA-Fragmenten

Unter der Annahme, daß ein Teil der rekombinierten Fragmente als inaktiver Komplex vorliegt, wurden die in Tabelle 5 angeführten Kombinationen zunächst unter Standardbedingungen mit Phenylalanin beladen, dann erhitzt und nach einer Vorinkubation bei 37°C erneut Enzym zugegeben. Vor dem Erhitzen wurde das Inkubationsgemisch auf einen sauren p_H-Wert gebracht, um eine Abspaltung der bereits gebundenen Aminosäure zu verhindern. In Tabelle 5 sind die genauen Versuchsbedingungen und die Ergebnisse angegeben. Man sieht, daß bei allen untersuchten Fragmentkombinationen die Akzeptoraktivität nach der zweiten Inkubation deutlich zunahm. Offenbar wurde also beim Erhitzen die Struktur der inkompetenten Fragmente und des inaktiven Komplexes aufgelöst, und es stellte sich beim langsamen Abkühlen ein neues Gleichgewicht ein. Der entstehende aktive Komplex konnte nach Zugabe von neuem Enzym aminoacyliert werden.

Zur Kontrolle wurden mehrere Versuche durchgeführt, bei denen wie in Legende zu Tabelle 5 beschrieben inkubiert wurde. Im ersten Kontrollversuch wurde jedoch nur bei der ersten Inkubation Synthetase zugegeben und die Reaktion nach Zugabe von 0,2 N Essigsäure und kurzem Erhitzen auf 60°C gestoppt. Im zweiten Kontrollversuch wurde nur bei der zweiten Inkubation Enzym zugegeben. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 5 angegeben. Das Ergebnis des zweiten Kontrollversu-

ches sagt aus, daß der Anstieg nach der zweiten Inkubation nicht auf den höheren Salzgehalt und das Erhitzen auf 60°C zurückgeführt werden kann.

Tabelle 5: Zunahme der Akzeptoraktivität von Fragmentkombinationen durch Erhitzen und zweimalige Inkubation mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase. Alle Proben wurden zunächst unter Standardinkubationsbedingungen (Methoden 3.17.), jedoch ohne CCA-Transferase und CTP inkubiert. Die Hälfte der Proben wurde mit Trichloressigsäure gefällt und abgesaugt (Akzeptoraktivität nach 1. Inkubation). Die andere Hälfte wurde mit je 5 µl 0,2 N Essigsäure versetzt, 2 Min. auf 60°C erhitzt und nach Vorinkubation bei 37°C (30 Min.) zu jeder Probe 80-100 µEinheiten Phenylalanyl-tRNA-Synthetase und 0,01 A_{280}-Einheiten Aldolase in 5 µl 0,4 M TRIS-HCl pH = 8,5 hinzugefügt. Es folgten 20 Min. Inkubation bei 20°C, Ausfällen mit Trichloressigsäure und Absaugen (Akzeptoraktivität nach 2. Inkubation).

	Akzeptoraktivität (%)				
	Phe 1-15 Phe$^+$21-76	Phe 1-33 Phe$^+$36-76	Phe 1-36 Phe$^+$48-76	Phe 1-27 Phe$^+$38-76	Phe 1-27 Phe$^+$48-76
1. Inkubation	33	18	11	9	8
2. Inkubation	53	43	19	16	12
1. Kontrollversuch	30	15	9	9	6
2. Kontrollversuch	35	18	12	10	10

4.2 Vergleich der Akzeptoraktivitäten verschiedener Fragmentkombinationen

Die im Methodenteil (3.17.) beschriebenen Inkubationsbedingungen erwiesen sich nach den vorhergehenden Untersuchungen zumindest für einige Fragmentkombinationen als optimal und wurden daher auf alle untersuchten Kombinationen angewendet, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen. Alle eingesetzten Fragmente

waren mindestens 95 % rein. Diese Aussage kann auf Grund der Ergebnisse aus der Oligonucleotidanalyse und der Diskelektrophorese gemacht werden. Zahlreiche Fragmente wurden gegeneinander "titriert", d. h. die Menge eines Fragments blieb stets konstant und wurde in verschiedenen Ansätzen jeweils mit steigenden Mengen des komplementären Fragments unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Auf diese Weise wurden die in Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21 gezeigten "Titrationskurven" erhalten. Bei den Versuchen wurde stets die Menge des CCA-Fragments konstant gehalten. In einigen Fällen (Phe 1-15 + Phe 21-76, Phe 1-36 + Phe 38-76, Phe 1-27 + Phe 38-76) erfolgte auch eine umgekehrte "Titration", d. h. steigende Mengen des CCA-Fragments wurden zu einem pG-Fragment gegeben, dessen Menge konstant blieb. In allen Fällen wurde das Plateau kurz nach oder am theoretischen Äquivalenzpunkt erreicht. In Tabelle 6 sind die Plateauwerte der Akzeptoraktivität für alle untersuchten Fragmentkombinationen zusammengefaßt. Jedes Fragment wurde einzeln getestet und ließ sich allein nur zu weniger als 2 % aminoacylieren. Während nach Spaltung im Anticodon (Phe 1-36 + Phe 38-76) die Akzeptoraktivität noch 70 % beträgt, ist sie bereits wesentlich niedriger (20 %), wenn vier Basen aus derselben Region fehlen (Phe 1-33 + Phe 38-76). Wenn die ganze Anticodonregion fehlt (Phe 1-27 + Phe 48-76), ist die aus den Fragmenten rekonstituierte tRNA nur noch zu etwa 8 % aminoacylierbar. Dieser Wert ist sehr niedrig, wurde aber in mehreren Experimenten bestätigt. Für die hU-Region lassen sich ähnliche Aussagen machen: je mehr Basen in der hU-Schleife fehlen, desto niedriger ist die Akzeptoraktivität (vergleiche Phe 1-15 + Phe 17-73 und Phe 1-15 + Phe 21-76). Werden die einzelnen tRNA-Hälften jeweils mit dem komplementären Viertelfragment kombiniert, so daß der Akzeptorstamm wieder hergestellt werden kann, erfolgt praktisch keine Aminoacylierung mehr (Phe 1-15 + Phe 38-76 und Phe 1-33 + Phe 58-76). Diese Ergebnisse werden zusammen mit den Ergebnissen an anderen tRNAs diskutiert.

Tabelle 6: Vergleich der Akzeptoraktivitäten verschiedener Fragmentkombinationen für Phenylalanin.
Die Akzeptoraktivität wurde wie beschrieben (Methoden 3.17.) bestimmt.

Fragmentkombination	pMol Phe/A_{260}-Einheit CCA-Fragment	Akzeptoraktivität (%)
$tRNA^{Phe}$(HCl)	1200	100
Phe 1-36 + Phe 38-76	1700	70
Phe 1-33 + Phe 38-76	500	20
Phe 1-36 + Phe 34-74*	1250	55
Phe 1-33 + Phe 34-74	1200	50
Phe 1-15 + Phe 38-76	--	2
Phe 1-18 + Phe 38-76	--	2
Phe 1-33 + Phe 58-76	--	2
Phe 1-27 + Phe 38-76	220	10
Phe 1-36 + Phe 48-76	300	10
Phe 1-27 + Phe 48-76	280	10
Phe 1-18 + Phe 21-76	760	50
Phe 1-18 + Phe 17-73*	780	50
Phe 1-15 + Phe 21-76	480	30
Phe 1-36 + Phe 21-76	780	50
Phe 1-33 + Phe 21-76	650	40
Phe 1-27 + Phe 21-76	1150	70
Phe 1-15 + Phe 17-73*	800	55
Phe 1-36 + Phe 38-65/66 * + Phe 58-76	900	20
Phe 1-27 + Phe 27-30** + + Phe 38-76	260	12

* Fragmente wurden vorher dephosphoryliert

** Oligonucleotid C-C-A-Gp aus Totalspaltung von $tRNA^{Phe}$ mit T1-RNase

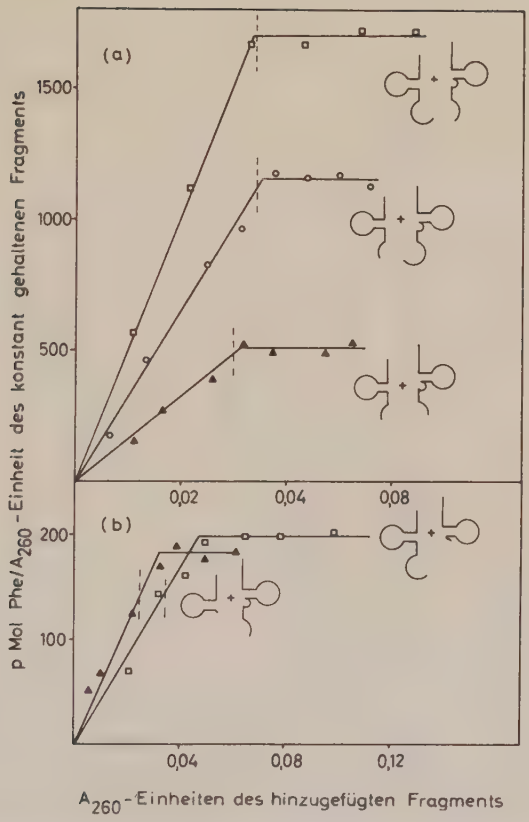

Abbildung 19: Vergleich der Akzeptoraktivitäten verschiedener Fragmentkombinationen. 0,032 A_{260}-Einheiten Phe 48-76, 0,030-0,045 A_{260}-Einheiten Phe 38-76 oder 0,03 A_{260}-Einheiten Phe 34-74 (desphosphoryliert) wurden mit steigenden Mengen der komplementären Fragmente inkubiert. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den theoretischen Äquivalenzpunkt an.

a) □——□ Phe 38-76 + Phe 1-36
○——○ Phe 34-74 + Phe 1-33
▲——▲ Phe 38-76 + Phe 1-33

b) □——□ Phe 48-76 + Phe 1-36
▲——▲ Phe 38-76 + Phe 1-27

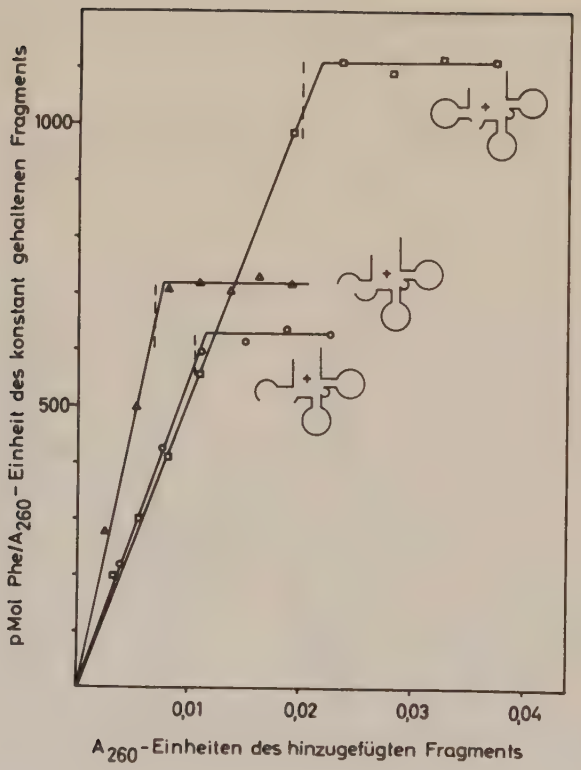

Abbildung 20: Vergleich der Akzeptoraktivitäten verschiedener Fragmentkombinationen. 0,038-0,055 A_{260}-Einheiten Phe 21-76 bzw. 0,025 A_{260}-Einheiten Phe 17-73 (dephosphoryliert) wurden mit steigenden Mengen der komplementären Fragmente inkubiert. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den theoretischen Äquivalenzpunkt an.

□——□ Phe 21-76 + Phe 1-27

Δ——Δ Phe 17-73 + Phe 1-15

○——○ Phe 21-76 + Phe 1-18

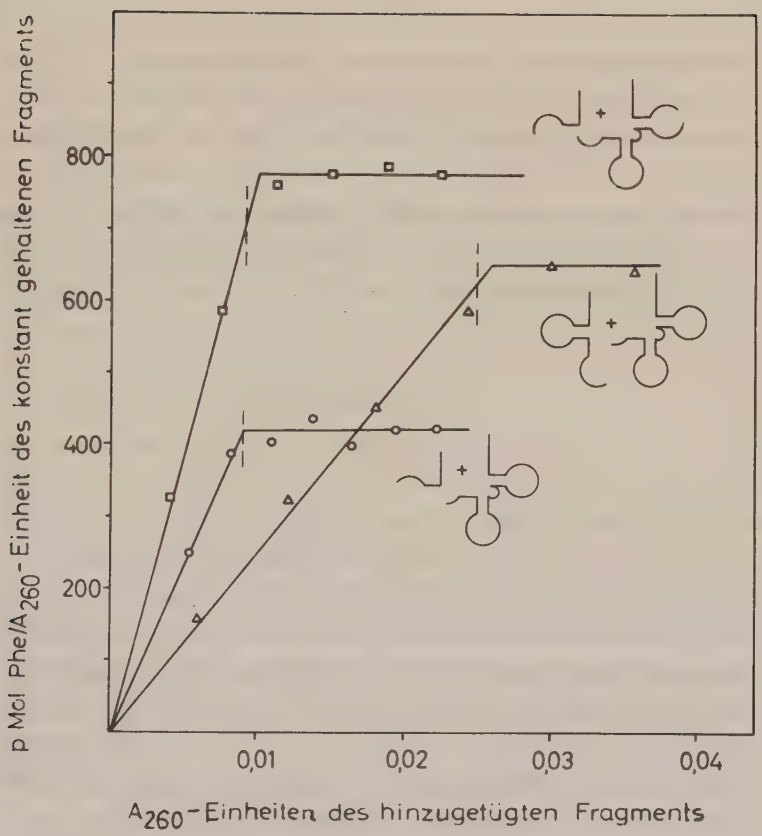

Abbildung 21: Vergleich der Akzeptoraktivitäten verschiedener Fragmentkombinationen. 0,03-0,038 A_{260}-Einheiten Phe 21-76 bzw. 0,03 A_{260}-Einheiten Phe 17-73 (dephosphoryliert) wurden mit steigenden Mengen der komplementären Fragmente inkubiert. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den theoretischen Äquivalenzpunkt an.

□——□ Phe 17-73 + Phe 1-18

△——△ Phe 21-76 + Phe 1-36

○——○ Phe 21-76 + Phe 1-15

4.3 Spezifität der Aminoacylierung von Fragmentkombinationen

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten zeigen, daß die Akzeptoraktivität abnimmt oder sogar verloren geht, wenn einige Nucleotide aus der $tRNA^{Phe}$ "herausgeschnitten" werden. Um zu prüfen, ob die Abnahme oder der Verlust der Akzeptoraktivität mit einem Verlust der Spezifität verbunden ist, wurden mehrere Fragmentkombinationen mit unfraktionierter Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Hefe auf die Beladbarkeit mit folgenden Aminosäuren getestet: Lys, Val, Glu, Asp, Pro, Ala, Leu, Met, Cys, Tyr, His, Thr, AsN, Arg und Gly. Folgende Fragmentkombinationen wurden untersucht:

Phe 1-18 + Phe 21-76
Phe 1-18 + Phe 38-76
Phe 1-18 + Phe 58-76
Phe 1-36 + Phe 58-76
Phe 1-36 + Phe 38-76
Phe 1-36 + Phe 48-76
Phe 1-36 + Phe 21-76

Die Inkubation wurde unter den Standardbedingungen bei 20°C ausgeführt (Methoden 3.17.). Im allgemeinen war der Befund eindeutig negativ. Eine ganz schwache Aminoacylierung mit Pro und Ala konnte für die Kombination Phe 1-36 + Phe 21-76 nachgewiesen werden. Da der inkorrekte Einbau von Aminosäuren in tRNA in einigen Fällen bei niedrigeren p_H besser ist (107, 108), wurde die Reaktion bei den p_H-Werten 7,5, 7,0, 6,5 und 6 durchgeführt. Die beste Beladung war bei dem für diese Reaktion üblichen p_H=7,5. In keinem Falle überstieg die Aminoacylierung jedoch 0,5 % der eingesetzten Fragmentkombination.

Das Problem der Fehlbeladung wurde auch im heterologen System untersucht. Statt eines Synthetasegemisches aus Hefe wurde ein solches aus E. coli benutzt. Die Aminoacylierungsreaktion wurde unter Standardbedingungen und in Gegenwart von 1,2M $(NH_4)_2SO_4$ ausgeführt. Der Zusatz von Ammoniumsulfat wurde gewählt, weil er sich bei der Beladung von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ durch Enzym aus E. coli bewährt hatte (58). Es konnte gezeigt werden, daß mit der Synthetase aus E. coli keine der Fragmentkombinationen unter den an-

gegebenen Bedingungen mit Phe beladbar ist. Dieses Resultat vereinfachte die auf heterologe Beladung zielenden Experimente. Ein Hydrolysat von ^{14}C-markiertem Algenprotein, also ein Gemisch aller Aminosäuren einschließlich Phe, konnte benutzt werden. Die Versuche zeigten eine Aminoacylierung von etwa 1-3 % nur mit der Kombination Phe 1-36 + Phe 38-76 in Gegenwart von $(NH_4)_2SO_4$. Eine bessere Abschätzung über das Ausmaß der Reaktion konnte nicht gemacht werden, da die spezifische Radioaktivität der einzelnen Aminosäuren im Gemisch sehr unterschiedlich war. Welche Aminosäuren an dieser Beladung beteiligt waren, wurde nicht untersucht, da eine Aminoacylierung von 2-3 % bei 20 radioaktiven Aminosäuren vernachläßigbar klein ist.

5. Untersuchungen über die Komplexbildung von Fragmenten

Bei der Bestimmung der Akzeptoraktivität zeigte es sich, daß die Fragmentkombinationen nie zu 100 % beladbar waren und in einigen Fällen (z. B. Phe 1-18 + Phe 38-76) überhaupt nicht aminoacyliert werden konnten. Um die Frage beantworten zu können, ob sich auch nicht-beladbare Fragmentkombinationen zu einem Komplex zusammenlagern, wurde eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter nicht-dissoziierenden Bedingungen durchgeführt. Nach kurzer Vorinkubation im Elektrophoresepuffer wurde das Fragmentgemisch auf ein harnstoffreies Gel aufgetragen, dessen Zusammensetzung im Methodenteil (3.19.) beschrieben ist. Aus Abb. 22 läßt sich entnehmen, daß unter nicht-dissoziierenden Bedingungen die untersuchten Fragmente assoziieren. So bilden z. B. die Hälften Phe 1-36 und Phe 38-76 einen Komplex, der sich im Gel wie ganze tRNA verhält. Wurden Phe 1-36 und Phe 38-76 getrennt auf zwei verschiedenen Bahnen des Gels aufgetragen, so wanderten sie ihrer Länge entsprechend wie tRNA-Hälften. Allerdings wurde in beiden Fällen auch dort eine schwache Bande beobachtet, wo ganze tRNA wandert, d. h. in einem geringen Ausmaß können sich zwei Moleküle desselben Fragments zu einem Komplex zusammenlagern, der in diesem Fall die Größe der ganzen tRNA hat. Zwei oder mehrere Moleküle $tRNA^{Phe}$ können offensichtlich ebenfalls miteinander reagieren, wobei tRNA-Aggregate entstehen, die bereits bei anderen

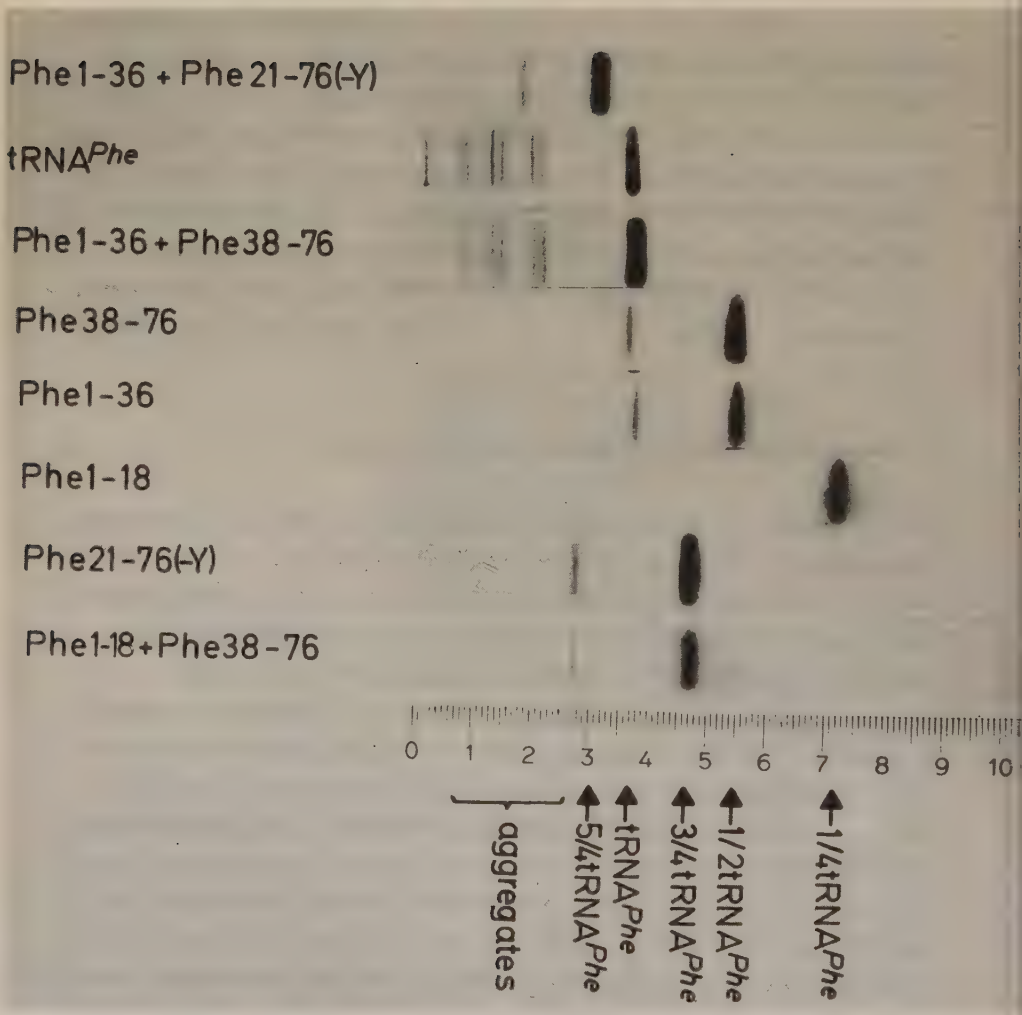

Abbildung 22: Elektropherogramm von Fragmenten aus $tRNA^{Phe}_{Hefe}$.

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde unter nicht-dissoziierenden Bedingungen wie beschrieben (Methoden 3.19.) durchgeführt.

tRNAs untersucht wurden (109, 110). Ein anderes Ergebnis, das man mit Hilfe der Gelelektrophorese unter nicht-dissoziierenden Bedingungen erhält, ist der Befund, daß auch die Fragmentkombination Phe 1-18 + Phe 38-76 einen Komplex bildet, der auf Grund seiner Wanderungsgeschwindigkeit etwa dreiviertel so groß ist wie ganze tRNA. Obwohl also die genannten Fragmente assoziieren, werden sie nicht aminoacyliert. Allerdings läßt die Gelmethode keine Aussagen über die zwei- und dreidimensionale Struktur des entstandenen Komplexes zu.

Aus Abb. 22 ist zu entnehmen, daß auch Phe 1-33 und Phe 21-76 einen Komplex bilden, der auf Grund seiner Wanderungsgeschwindigkeit größer als $tRNA^{Phe}$ ist. Unter Berücksichtigung des Kleeblattmodells kann man für diesen Komplex drei verschiedene Strukturen diskutieren, die in Abb. 23 schematisch dargestellt sind. Es wurden Versuche ausgeführt, die zeigen sollten, welche der gezeigten Strukturen wirklich vorliegen. Zu diesem Zweck wurde der Komplex zunächst mit Schlangengift-Phosphodiesterase bzw. in einem anderen Versuch mit Milz-Phosphodiesterase in Anwesenheit von $MgCl_2$ inkubiert. Nach Elektrophorese wurde versucht, aus dem Abbaumuster zu entnehmen, welche der möglichen Strukturen tatsächlich vorlagen. Die Interpretation der Spaltmuster erwies sich jedoch als sehr schwierig, und es konnte keine Entscheidung zugunsten einer der Strukturen getroffen werden. Daher wurde versucht durch Partialspaltung mit T1-RNase eindeutige Hinweise zu bekommen. R. Thiebe aus unserem Labor hatte gefunden, daß $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ unter bestimmten Bedingungen nur in der hU-Schleife gespalten wird, und die Fragmente Phe 1-18 und Phe 21-76 entstehen (111). Unter diesen Partialspaltungsbedingungen sollte der Komplex aus Phe 1-33 + Phe 21-76 auch in der hU-Schleife und zusätzlich in den heraushängenden einsträngigen Bereichen gespalten werden. Wenn man voraussetzt, daß die heraushängenden Sequenzen wirklich einsträngig sind, und sie nicht durch Rückfaltung oder Wechselwirkung mit anderen Bereichen der tRNA gegen den Angriff der Nuclease geschützt sind, sollten je nach Art der vorliegenden Struktur verschiedene Fragmente entstehen. Es seien hier nur die wichtigsten angegeben (vergleiche Abb. 23)

Struktur I : Phe 1-18, Phe 21-30, Phe 31-76

Struktur II : Phe 1-18 Phe 27-76

Struktur III : Phe 1-18 oder Phe 1-15, Phe 21-76

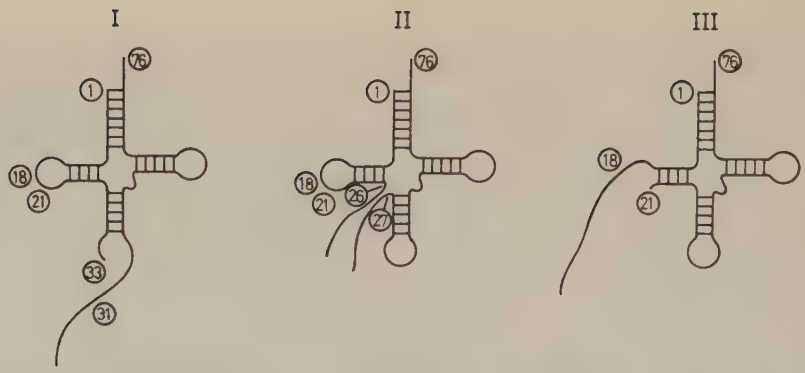

Abbildung 23: Schematische Darstellung von drei möglichen Strukturen für den Komplex Phe 1-33 + Phe 21-76

Die einzelnen Strukturen lassen sich also dadurch voneinander unterscheiden, daß bei der T1-RNase Spaltung jeweils ein anderes hinsichtlich der Länge charakteristisches Fragment entsteht. Aus den R_B-Werten der Fragmente, die nach Partialspaltung und Elektrophorese tatsächlich im Gel auftreten, lassen sich daher Rückschlüsse ziehen, welche Struktur wirklich vorliegt.

Aus Abb. 24 ist zu entnehmen, daß bei der Spaltung Fragmente auftraten, die hinsichtlich der Länge den Fragmenten Phe 1-18, Phe 21-30 (11 N), Phe 31-76 (46 N), Phe 27-76 (50 N) und Phe 21-76 entsprechen. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, daß offenbar alle drei in Abb. 23 gezeigten Strukturen nebeneinander vorliegen.

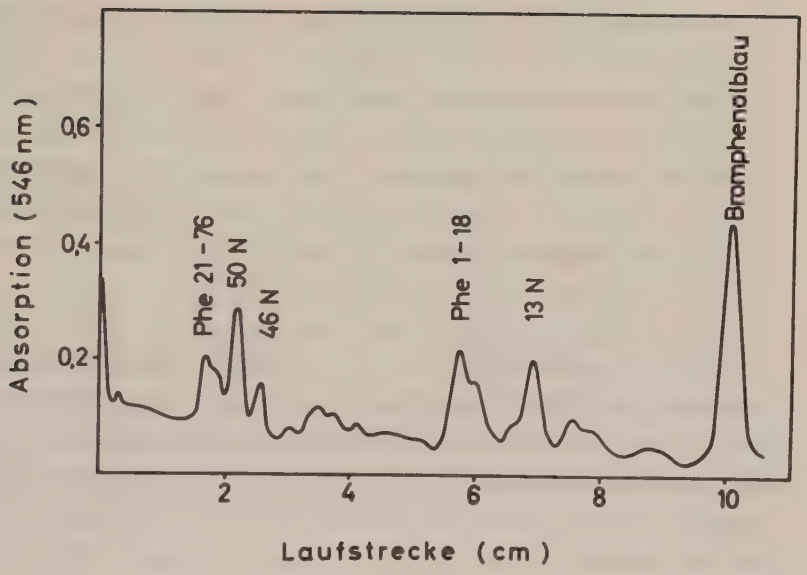

Abbildung 24: Densitogramm des Spaltmusters nach Partialspaltung der Fragmentkombination Phe 1-33 + Phe 21-76 mit T1-RNase.
1,5 A_{260}-Einheiten Phe 21-76 und 1,2 A_{260}-Einheiten Phe 1-33 wurden in 20 µl 0,2 M TRIS-HCl pH = 7,5, 0,01 M $MgCl_2$ mit 50 Einheiten T1-RNase inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und jeweils 0,1 A_{260}-Einheiten auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Densitogramm des Spaltmusters nach 40 Min. Inkubation ist abgebildet.

6. Diskussion

In dem zur Diskussion stehenden Teil der Arbeit wurde die Darstellung mehrerer Fragmente aus $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ beschrieben. Die Hälften aus der Partialspaltung mit Pankreas-RNase wurden bereits bei der Strukturaufklärung von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ isoliert (101). Durch Partialspaltung mit T1-RNase erhielten Schmidt und Reid (94) Fragmente aus $tRNA^{Phe}_{Hefe}$, die jedoch nicht getrennt und analysiert wurden. Vermutlich waren diese Fragmente identisch mit Phe 1-18 und Phe 21-76. Unter anderen Spaltbedingungen erhielten Schmidt et al. (95) Phe 1-18, Phe 58-76 und Phe 21-57; die beiden ersten Fragmente wurden jedoch nicht voneinander getrennt. Beltchev und Grunberg-Manago (79) beschrieben die Spaltung von $NaBH_4$-reduzierter $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ mit Säure und Anilin. Aus unserem Labor wurden zwei Arbeiten veröffentlicht, in denen die Darstellung von Fragmenten durch chemische Spaltung (78) oder Abbau mit einer Exonuclease (97) beschrieben wurde.

Mit T2-RNase wurde $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ am 3`-Ende, in der hU-Schleife und in der Anticodonregion, mit Pankreas-RNase nahezu ausschließlich neben dem Anticodon und am 3`-Ende gespalten. Die bevorzugte Spaltung in der hU- und Anticodonschleife kann in der Weise interpretiert werden, daß diese Regionen der $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ besonders exponiert sind, und die TUC-Schleife so in die Raumstruktur integriert ist, daß sie nicht angegriffen werden kann. Ähnliche Ergebnisse wurden auch an anderen tRNAs erhalten (z. B. 76, 87, 88).

Auffallend ist, daß bei der Behandlung mit Pankreas-RNase praktisch keine Viertel- und Dreiviertelfragmente aus einer Spaltung in der hU-Region entstanden sind. Wenn man nur die Basenspezifität betrachtet, sollte Pankreas-RNase ebenso wie T2-RNase sowohl in der Anticodonschleife als auch in der hU-Schleife spalten können. Um auszuschließen, daß pH-abhängige Konformationsänderungen der tRNA die unterschiedlichen Spaltmuster verursachen, wurden beide Reaktionen bei gleichem pH-Wert und zwar bei pH = 6,0 durchgeführt. Auch bei diesem pH-Wert wurde mit T2-RNase am 3`-Ende, in der hU-Schleife und der Anticodonregion und mit Pankreas-RNase nur am 3`-Ende und neben dem Anticodon gespalten.

Eine mögliche Erklärung, warum Pankreas-RNase nicht in der hU-Schleife spaltet, bietet die Annahme, daß das Enzym die Bindung zwischen Dihydrouridin und einem benachbarten Nucleotid langsamer angreift als die zwischen Uridin und Cytidin und dem gleichen Nucleotid. Eine andere Erklärung bietet eine Hypothese, die von Pinder und Gratzer aufgestellt wurde (112). Sie postulierten, daß die Spezifität einer Spaltung nicht nur durch eine Base, die mit dem aktiven Zentrum der Nuclease in Wechselwirkung tritt, bestimmt wird, sondern auch durch benachbarte Nucleotidsequenzen, die von sogenannten "subsites" des Enzyms erkannt werden. Eine Spaltung ist an solchen Stellen erleichtert, in deren Nachbarschaft Nucleotidsequenzen sind, die von diesen "subsites" erkannt werden können. Da die "subsites" verschiedener Enzyme auch unterschiedliche Anforderungen an die Zusammensetzung der benachbarten Nucleotidsequenzen stellen, können z. B. T2-RNase und Pankreas-RNase in verschiedenen Regionen einer tRNA bevorzugt spalten.

In Übereinstimmung mit Ergebnissen an ganzer tRNA (97, 103) stehen die Ergebnisse, die beim Abbau von Fragmenten mit Exonucleasen erhalten wurden: Seltene Basen und doppelsträngige Regionen scheinen offensichtlich den Abbau an bestimmten Stellen zu verlangsamen. Es bietet sich so die Möglichkeit, durch Kombination von Endo- und Exonucleasen Fragmente zu erhalten, die bisher schwer darstellbar waren.

Keines der beschriebenen Fragmente von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ ließ sich mit Aminosäure beladen, wenn es allein getestet wurde. Zwei Fragmente, die sich auf Grund des Kleeblattmodells zu einem Komplex zusammenlagern können, wurden in vielen Fällen aminoacyliert, wenn sie gemeinsam inkubiert wurden. Da man annehmen muß, daß für die Aminoacylierung eine Assoziation der Fragmente zu einem Komplex erforderlich ist, wurde mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht-dissoziierenden Bedingungen untersucht, ob auch nicht oder nur wenig beladbare Fragmentkombinationen einen Komplex bilden. So ließ sich zeigen, daß z. B. Phe 1-18 + Phe 36-76 sich zu einem Hybridmolekül zusammenlagerten und trotzdem nicht aminoacyliert wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Fragmenten aus $tRNA^{Val}_{Hefe}$ erhalten (113).

Die Gelelektrophorese erlaubt keine Aussage darüber, ob komplementäre Fragmente einen Komplex bilden, der eine Struktur wie die native tRNA besitzt. Vermutlich sind Komplexe, die nicht die richtige zwei- und dreidimensionale Struktur haben, biologisch inaktiv. Hinweise auf das Vorliegen solcher inaktiver Komplexe brachten Ergebnisse aus Versuchen, bei denen eine Fragmentkombination zunächst durch Inkubation mit Aminosäure und Synthetase bis zur Sättigung aminoacyliert wurde. Durch Zugabe von Säure wurde die Reaktion gestoppt, das Fragmentgemisch kurz erhitzt und nach einer Vorinkubation erneut mit Synthetase bei neutralem pH-Wert inkubiert. Es zeigte sich, daß bei allen untersuchten Fragmentkombinationen die Akzeptoraktivität nach der zweiten Inkubation deutlich über dem Wert der ersten Inkubation lag. Das Ergebnis kann so gedeutet werden, daß neben aktiven auch inaktive Komplexe vorliegen, und unter den Versuchsbedingungen ein Teil der inaktiven in aktive Komplexe übergeführt wird. Das Vorkommen von inaktiven Komplexen im Gleichgewicht mit aktiven könnte auch erklären, warum die untersuchten Fragmentkombinationen nie zu 100 % beladen wurden.

Für eine dreidimensionale Struktur der nativen tRNA gibt es zahlreiche Hinweise, und es werden mehrere Raumstrukturmodelle diskutiert (18, 19). Da denaturierte tRNAs nicht aminoacyliert werden (114, 115), muß die Tertiärstruktur bei der tRNA-Synthetase-Wechselwirkung eine Rolle spielen. Andererseits kann man ausschließen, daß die Raumstruktur als Ganzes essentiell ist, denn dann sollten aus Fragmenten zusammengesetzte tRNAs und auch tRNA-Aggregate (109, 110), die sicher eine veränderte Raumstruktur haben, nicht mehr aminoacyliert werden. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß einige Elemente der Raumstruktur intakt sein müssen, um zwischen tRNA und Synthetase eine Wechselwirkung zu ermöglichen, die zu einer Veresterung mit der Aminosäure führt. Die eigentliche Spezifität kann dann dennoch durch Nucleotidsequenzen bestimmt werden.

Ein Vergleich der Akzeptoraktivitäten verschiedener Fragmentkombinationen von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ zeigt, daß die Anticodonregion für die Synthetaseerkennung nicht essentiell ist. So wurde die Fragmentkombination Phe 1-27 + Phe 48-76 noch zu 10 % aminoacyliert, obwohl sämtliche Nucleotide aus dem Anticodonstamm und der zu-

gehörigen Schleife fehlen. Da in der Anticodonschleife jeder tRNA derselben Spezies stets ein anderes Basentriplett ist, könnte dieser Bereich außer für die Spezifität der mRNA-Bindung auch für die der Akzeptoraktivität verantwortlich sein. Ergebnisse aus früheren Untersuchungen an $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ wie auch an anderen tRNAs haben jedoch bereits gezeigt, daß Veränderungen in dieser Region nur geringe Auswirkungen auf die Aminoacylierung haben. So konnten $tRNA^{Val}_{Hefe}$ (76), $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ (96), $tRNA^{Tyr}_{Torulopsis}$ (51), $tRNA^{Val}_{Coli}$ (87), $tRNA^{Ala\ II}_{Hefe}$ (92) und $tRNA^{Ser}_{Hefe}$ (116), im oder neben dem Anticodon gespalten werden, ohne daß die Akzeptoraktivität verloren ging. In einigen Fällen konnte die tRNA auch noch aminoacyliert werden, wenn mehrere Nucleotide fehlten (78, 84). Unabhängig von den Ergebnissen der Fragmentmethode zeigten auch die Ergebnisse aus anderen Versuchen, daß das Anticodon für die Synthetaseerkennung nicht essentiell ist. Spezifische Modifikationen in dieser Region bei $tRNA^{Ser}_{Hefe}$ (117), $tRNA^{Ala}_{Hefe}$ (118) und $tRNA^{Gly}_{Coli}$ (119) bewirken keinen Verlust der Akzeptoraktivität. Außerdem sind isoakzeptierende tRNAs bekannt, die von der gleichen Synthetase mit Aminosäure beladen werden, obwohl sie verschiedene Anticodons haben (z. B. 26, 120).

Trotz der zahlreichen Ergebnisse, die gegen eine Beteiligung der Anticodonschleife an der Synthetaseerkennung sprechen, kann man diesen Befund jedoch nicht verallgemeinern. So wurde von Mirzabekov et al. (85) beschrieben, daß die Akzeptoraktivität von $tRNA^{Val}_{Hefe}$ verloren ging, wenn zwei Nucleotide aus dem Anticodon entfernt wurden. Andererseits war es durchaus möglich, bei der gleichen tRNA an anderer Stelle in der Anticodonschleife fünf Nucleotide abzuspalten, ohne daß es zu einem totalen Verlust der Aminoacylierbarkeit kam (84). Die Autoren nehmen an, daß das Dinucleotid im Anticodon und ein weiteres Dinucleotid vom 5`-Ende des Akzeptorstammes Teile der spezifischen Erkennungsregion für Valyl-tRNA-Synthetase sind. Auch an $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ ist unabhängig von Ergebnissen der Fragmentmethode ein Ergebnis bekannt, das auf eine Beteiligung der Anticodonschleife hinweist: Während $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ durch Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus E. coli aminoacyliert wird, akzeptiert $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ (HCl) in der heterologen Reaktion keine Aminosäure mehr (68). Dieses Ergebnis kann jedoch so interpretiert werden, daß mit der Abspaltung der Base Y eine Raumstrukturänderung der tRNA verbunden ist, die dazu führt, daß im Gegensatz zur homologen Reaktion bei der heterologen

Reaktion keine Beladung mit Aminosäure mehr stattfindet. Die Synthetase aus E. coli scheint also andere Anforderungen an die Struktur der Nucleinsäure zu stellen als das entsprechende Hefeenzym.

Auch eine etwaige Beteiligung der hU-Region bei der Erkennung der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase wurde mit den beschriebenen Fragmenten aus $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ untersucht. Da die Kombination Phe 1-15 + Phe 21-76, bei der fünf Nucleotide aus der hU-Schleife fehlen, noch zu etwa 30 % beladen wurde, kann diese Region nicht essentiell für die Synthetaseerkennung sein. Andererseits wurde die Fragmentkombination Phe 1-15 + Phe 38-76, bei der kein hU-Stamm und kein Anticodonstamm mehr ausgebildet werden können, nicht aminoacyliert. Dieses Ergebnis beinhaltet allerdings nicht unbedingt, daß der hU-Stamm ein wesentlicher Teil der Erkennungsregion ist. Man muß nämlich berücksichtigen, daß sich bei dieser Kombination aus einer tRNA-Hälfte und einem Viertelfragment möglicherweise eine Raumstruktur ausbildet, die keine richtige Wechselwirkung mit der Synthetase zuläßt.

Untersuchungen über die Beteiligung der hU-Region von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ an der Synthetaseerkennung wurden auch von J. Schmidt et al. durchgeführt (94). Da die Autoren jedoch keine Kriterien für die Reinheit ihrer Fragmente angeben und auch eindeutige Analysen fehlen, sind ihre Ergebnisse nur von begrenzter Aussagekraft.

Ergebnisse aus Untersuchungen an $tRNA^{fMet}_{Coli}$ (88), $tRNA^{Ala\ II}_{Hefe}$ (93) und $tRNA^{Val}_{Hefe}$ (85) zeigen ebenfalls, daß Nucleotide in der hU-Schleife fehlen können, ohne daß die Akzeptoraktivität verloren geht. Andererseits wurde berichtet (89), daß $tRNA^{fMet}_{Coli}$ nur noch in einem geringen Ausmaß aminoacyliert wurde, wenn eine Base in dem hU-Stamm fehlte. Ein intakter Doppelstrang scheint also in dieser Region für die Aminoacylierung erforderlich zu sein.

Außer den bisher diskutierten Regionen wurden mit Hilfe der Fragmentmethode auch die TψC-Region und die S-Region von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ untersucht. Da die Fragmentkombination Phe 1-36 + Phe 48-76 noch zu etwa 10 % aminoacyliert wurde, kann nicht nur die Anticodonregion sondern auch die S-Region als essentielle Erkennungsregion ausgeschlossen werden. R. Thiebe in unserem Labor hat

$tRNA^{Phe}_{Hefe}$ in der hU-Region und der TψC-Schleife gespalten und die 3 entstandenen Fragmente isoliert. Nach dem Zusammengeben ließen sich die Fragmente noch zu etwa 15 % beladen (145). Ein ähnliches Ergebnis wurde von J. Schmidt et al. beschrieben (95). Ein Vergleich mit anderen tRNAs zeigt, daß auch $tRNA^{Val}_{Hefe}$ (80) und $tRNA^{Ala\ II}_{Hefe}$ (93) in der TψC-Region und $tRNA^{Tyr}_{Coli}$ (90) in der S-Region gespalten werden konnten, ohne daß die Akzeptoraktivität vollständig verschwand.

Es ist bisher nicht möglich, aus den vielen teilweise widersprüchlichen Einzelergebnissen allgemeingültige Aussagen über die Synthetaseerkennungsregion zu machen. So ist es auch noch keinesfalls sicher, daß nur eine einzige Nucleotidsequenz für die Spezifität verantwortlich ist, denn die Erkennungsregion könnte auch mehrere in der Primärstruktur nicht zusammenliegende Nucleotidsequenzen, die in der Tertiärstruktur aber vielleicht benachbart sind, enthalten. Auch brauchen die Synthetaseerkennungsregionen keineswegs bei allen tRNAs in homologen Bereichen der Sequenz zu liegen.

Hypothesen über die Synthetaseerkennungsregion wurden von verschiedenen Autoren aufgestellt. So postulierten Schulmann und Chambers (21), daß die ersten drei Basenpaare im Akzeptorstamm ein wesentlicher Bestandteil der Erkennungsregion sind. Die Ergebnisse, die zu dieser Hypothese führten, stammten aus Modifizierungsversuchen an $tRNA^{Ala}_{Hefe}$. In einer anderen Veröffentlichung (93) unterstützten sie ihre Hypothese durch ein Ergebnis aus Beladungsversuchen von Fragmenten aus $tRNA^{Ala\ II}_{Hefe}$. Sie berichteten, daß Viertelfragmente, die nur den Akzeptorstamm ausbilden können, noch zu 3-5 % beladen wurden. Die angegebenen Reinheitskriterien für die einzelnen Fragmente reichen jedoch nicht aus, um sicher sagen zu können, daß nicht kleine Mengen verunreinigender Fragmente für diese sehr geringe Akzeptoraktivität verantwortlich sind.

Die eigenen Ergebnisse aus Versuchen mit Fragmenten von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ unterstützen die Akzeptorstammhypothese nicht, denn die Kombination Phe 1-15 + Phe 38-76 wird nicht oder zu weniger als 2 % mit Aminosäure beladen. Auch andere mit der Fragmentmethode erhaltene Ergebnisse an $tRNA^{Val}_{Hefe}$ (81), $tRNA^{fMet}_{Coli}$ (91) und

$tRNA^{Ser}_{Hefe}$ (97) stehen nicht in Einklang mit der Hypothese. Im direkten Widerspruch zu der Hypothese steht die Tatsache, daß bei den vor kurzem aufgeklärten Nucleotidsequenzen von $tRNA^{Val\ IIa}_{Coli}$ (121), $tRNA^{Val\ IIb}_{Coli}$ (121), $tRNA^{Gly\ III}_{Coli}$ (122) und $tRNA^{Leu}_{Coli}$ (123) die drei ersten Basenpaare im Akzeptorstamm identisch sind.

Eine andere speziell für die Erkennungsregion von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe aufgestellte Hypothese stammt von Dudock et al. (22). Sie postulierten, daß die Basensequenz im hU-Stamm für die Spezifität verantwortlich ist, da die genannte Synthetase $tRNA^{Phe}_{Hefe}$, $tRNA^{Phe}_{Weizen}$, $tRNA^{Phe}_{Coli}$ und $tRNA^{Val}_{Coli}$, die alle die gleiche Nucleotidsequenz im hU-Stamm haben, mit Phenylalanin belädt. Ihre Hypothese beruht auf Ergebnissen aus heterologen Beladungen, bei denen in einigen Fällen das Inkubationsgemisch einen sehr niedrigen pH-Wert hatte. Es ist fraglich, ob unter diesen besonderen Bedingungen die Synthetase bei der Aminoacylierung die gleichen Anforderungen an die Struktur einer tRNA stellt wie unter den Bedingungen der homologen Beladung. Unterstützt werden diese Bedenken durch neuere Ergebnisse (126), die zeigen, daß unter bestimmten Bedingungen (z. B. niedrige Ionenstärke, hohes Mg^{++}: ATP-Verhältnis, alkalischer pH-Wert, großer Enzymüberschuß, Anwesenheit von Dimethylsulfoxid u. a. m.) eine Vielzahl von heterologen Beladungen möglich ist. Beim Vergleich der Primärstrukturen aller tRNAs, die bei diesen Versuchen von der gleichen Synthetase beladen werden, findet man keine gemeinsame Nucleotidsequenz, die eindeutig als Synthetaseerkennungsregion in Frage kommen könnte. Weiter läßt sich gegen die Hypothese von Dudock et al. einwenden, daß sie eine Beteiligung der Tertiärstruktur an der tRNA-Synthetase-Wechselwirkung, für die es deutliche Hinweise gibt (z. B. 114, 115), außer acht läßt.

Die eigenen Ergebnisse sprechen nicht gegen den hU-Stamm als spezifische Erkennungsregion, denn die Fragmentkombination Phe 1-27 + Phe 38-76, die einen hU-Stamm ausbilden kann, wird noch aminoacyliert, während die Kombination Phe 1-15 + Phe 38-76, bei der kein hU-Stamm mehr ausgebildet werden kann, nicht mehr beladen wird. Es ist allerdings möglich, daß bei dem zuletzt genannten Komplex die Tertiärstruktur der tRNA bereits so stark verändert ist,

daß allein aus diesem Grund keine Aminoacylierung erfolgen kann. Andererseits lassen die zur Verfügung stehenden Fragmente keine Aussage darüber zu, ob tatsächlich alle Basenpaarungen im hU-Stamm vorhanden sein müssen.

Neben der Fragmentmethode haben vor allem die Modifizierung und der Strukturvergleich isoakzeptierender tRNAs die Ergebnisse geliefert, auf denen unsere heutigen Vorstellungen über die Synthetaseerkennungsregion beruhen. Die Ergebnisse der zuletzt genannten Methode sind nur dann wirklich aussagekräftig, wenn die isoakzeptierenden tRNAs und die Synthetase aus dem gleichen Organismus stammen, da dann die Einflüsse der bereits erwähnten besonderen Inkubationsbedingungen bei heterologen Aminoacylierungen nicht berücksichtigt zu werden brauchen. Bisher sind jedoch noch ziemlich wenig Nucleotidsequenzen solcher isoakzeptierender tRNAs bekannt. Die beiden zuerst genannten Methoden haben den gemeinsamen Nachteil, daß mit ihrer Anwendung Änderungen in der Tertiärstruktur der untersuchten tRNAs verbunden sind. So kann ein Verlust der Akzeptoraktivität bei Komplexen aus relativ kurzen Fragmenten allein dadurch bedingt werden, daß nicht die richtige Raumstruktur ausgebildet wird. Auch bei Modifizierungen kann die Raumstruktur der tRNA gestört werden. Außerdem wird die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode dadurch eingeschränkt, daß die Modifizierungsreaktion sehr selektiv, und ihre Auswirkung auf alle Nucleotide der untersuchten tRNAs genau bekannt sein muß.

Da jede der genannten Methoden für sich allein nur Ergebnisse mit begrenzter Aussagekraft liefern kann, ist es nötig, alle drei Methoden zu kombinieren, um mehr über die Synthetaseerkennungsregion zu erfahren. Ergebnisse, die mit Hilfe der Fragmentmethode erhalten werden, erlauben nur die Aufstellung eines Negativkataloges (127), in dem solche Sequenzen aufgeführt sind, die nicht essentiell für die Synthetaseerkennung sind. Bei $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ gehören die gesamte Anticodonregion, die hU-Schleife und die S-Region in diesen Negativkatalog.

IV. Beschreibung der Versuche

1. Materialien

Unfraktionierte tRNA aus Brauereihefe und unfraktionierte tRNA aus E. coli wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim bzw. General Biochemicals, Chagrin Falls Ohio bezogen. $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ (128), $tRNA^{Phe}_{Hefe}$(HCl) (128) und die Hälften (129) aus $tRNA^{Phe}_{Hefe}$(HCl), die man durch Spaltung mit Anilin erhält, wurden wie beschrieben hergestellt. Die Fragmente Phe 1-18, Phe 21-76 und Phe 58-76 wurden durch Partialspaltung von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$(HCl) mit T1-RNase erhalten (111) und von R. Thiebe zur Verfügung gestellt.

Unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase (EC 6.1.1.-) aus Brauereihefe sowie 200- bis 300-fach angereicherte Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (106) wurden von R. Hirsch und U. Pachmann zur Verfügung gestellt. Unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus dem Hefestamm S. cerevisiae α S288C und aus E. coli B wurden wie das entsprechende Enzym aus Brauereihefe hergestellt.

90- bis 100-fach angereicherte CCA-Transferase (EC 2.7.7.25) wurde von H. Overath zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte wie beschrieben (130). RNase-freie Aldolase war ein Geschenk von W. Krietsch. T1-Ribonuclease (EC 2.7.7.26) und T2-Ribonuclease (EC 2.7.7.-) wurden von der Fa. Sankyo Co., Tokio, bezogen. Bei den Versuchen wurden die vom Hersteller angegebenen Enzymeinheiten zugrunde gelegt. Pankreas-Ribonuclease (EC 2.7.7.16) war ein Produkt der Fa. Boehringer Mannheim und hatte 40 Einheiten (131)/mg Protein. Schlangengift-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) wurde aus Schlangengift von Crotalus adamanteus von H. Feldmann isoliert (132) und für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Das Enzym wurde in Anwesenheit von 5 % Glykol bei -20°C aufbewahrt und enthielt 460 Einheiten (133) pro ml. Schweinemilz-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.-)

wurde von P. Philippsen nach der Methode von A. Bernardi et al. (134) gereinigt und zur Verfügung gestellt. Das Enzym wurde in 80 %iger Ammoniumsulfatsuspension bei +4°C aufbewahrt. Für die Versuche wurde eine verdünnte Lösung benutzt, die 460 Einheiten (134)/ml enthielt. Alkalische Phosphatase (Phosphomonoesterase) aus E. coli (EC 3.1.3.1) wurde von Worthington Biochemical Corp. Freehold. N. J. bezogen und nach einer bekannten Vorschrift (135) gereinigt.

DEAE-Cellulose (DEAE-SH, Kapazität 0,6-1,2 mäq/g) wurde von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen. DEAE-Cellulose DE 23 (Kapazität 1 mäq/g) stammte von der Fa. Whatman. DEAE-Sephadex A 25 (Kapazität 3,5 $\pm$ 0,5 mäq/g, Partikelgröße 40-120 µ) war ein Produkt der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden. Benzoylierte DEAE-Cellulose (BD-Cellulose) wurde nach einer Vorschrift von Gillam et al. (72) in unserem Labor hergestellt oder von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen, Kationenaustauscherharz AG 50W-X8 von Bio Rad wurde bei der Fa. Calbiochem, Los Angeles, gekauft.

Glasperlen (Durchmesser 45-50 µ) wurden von der Fa. B. Braun, Melsungen bezogen. Für die Papierchromatographie und Papierelektrophorese wurde Papier 2043 b Mgl. der Fa. Schleicher und Schüll, Einbeck benutzt.
Zur Dünnschichtchromatographie wurden Cellulose-Platten der Fa. E. Merck, Darmstadt, benutzt.

Zum Abfiltrieren von gefällter tRNA wurden Glasfaserfilter GF/C der Fa. Whatman und Membranfilter MF 50 der Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen, benutzt. Dialysierschläuche wurden von der Fa. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen.

Reagentien waren, wenn nicht anders angedeutet, von der Fa. E. Merck, Darmstadt, Reinheitsgrad "p. A." CTP (Tri-Natriumsalz) war ein Produkt der Fa. Boehringer, Mannheim. ATP (Na_2H_2ATP) stammte von der Fa. Zellstoff Waldhof. Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid und 5'5 Diäthylbarbitursäure wurden von der Fa. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen. "Stains-all" (1-Äthyl-2-(3-(1-äthylnaphto(1,2 d) thiazolin-2 yliden)-2-methyl-propenyl)-naphto (1,2 d) thiazoliumbronid) (136) wurde bei der Fa. Eastman Kodak Rochester, New York,

gekauft. Macaloid wurde von der American Tansul Co., Baroid Division, National Lead Co., Houston, Texas, bezogen.

Rinderserumalbumin und Natriumodecylsulfat wurden bei Serva Entwicklungslabor, Heidelberg und Cysteaminhydrochlorid bei Fluka AG., Buchs, Schweiz, gekauft. Helicase, ein lyophilisierter Extrakt aus dem Darm der Schnecke Helix Pomatia, wurde von L'Industrie Biologique Francais S.A Gennevilliers (Seine), Frankreich, bezogen. Der Hefeextrakt war ein Produkt der Fa. Oxoid Limited, London. Lösungsmittel: Toluol und Dioxan wurden vor Gebrauch mit Natrium am Rückfluß gekocht und anschließend destilliert. Äthanol war mit Methyläthylketon vergällt.

Radioaktive Reagentien: ^{14}C- und ^{3}H-Aminosäuren wurden von New England Nuclear Corp., Boston, Mass., oder von der Fa. Radiochemical Centre, Amerham, erhalten. $NaBT_4$ (200 C/M) war ein Produkt von New England Nuclear Corp., Boston, Mass. Toluolszintillator enthielt 4 g Omnifluor (New England Nuclear Corp., Boston, Mass.) in 1 l über Natrium destilliertes Toluol. Bray-Szintillator (137) enthielt in einem Liter 60 g Naphtalin, 4 g Omnifluor, 100 ml Methanol (abs.), 20 g Glykol (dest.) und Dioxan.

2. Apparative Hilfsmittel

Zur Messung der UV-Absorption wurde entweder ein Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen, oder ein registrierendes Spektralphotometer, Cary Modell 15, Varian Ass., benutzt.

Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard Instrument Inc., La Grange, Illinois, Tricarb-Modell 3310 oder 3375) vorgenommen. Die Radioaktivität auf Chromatogrammen oder Papierelektrophorogrammen wurde mit einem Dünnschicht-Scanner II, Berthold LB 2722, der Fa. Berthold bestimmt. Zur Konstanthaltung des p_H-Wertes bei Nuclease-Spaltungen wurde ein Autotitrator der Fa. Radiometer, Kopenhagen, benutzt. Für die Gelelektrophorese wurde der Elektrophoresekasten EC 490 der Fa. E-C Apparatus

Corp., Philadelphia, verwendet. Die Densitogramme der Gele wurden mit einem umgebauten Photometer der Fa. Zeiss, Oberkochen, bei der Wellenlänge 546 mμ aufgenommen. Zum Aufschließen der Hefe wurde ein Merkenschlager-Desintegrator der Fa. B. Braun, Melsungen, benutzt.

3. Methoden

3.1 Kulturbedingungen für die verwendeten Hefestämme

S. cerevisiae α S288C stammte von G. R. Fink, Department of Genetics, Cornell University, Ithaka, N. Y.

Der Hefestamm wurde auf Agar-Platten folgender Zusammensetzung aufbewahrt: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glucose, 2 % Agar-Agar; Das flüssige Kulturmedium enthielt 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton und 1 % Glucose. Es wurde 20 Min. bei 1 atü und 120°C im Autoklaven sterilisiert. Von einer Agar-Platte wurde eine Kolonie mit einer sterilen Nadel in 50 ml flüssiges Kulturmedium übergeimpft. Diese Vorzucht wurde 24 Stunden unter Rühren bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurden mit einer sterilen Pipette 5 ml entnommen und in 10 Liter Kulturmedium pipettiert, das 0,3-0,5 ml Silicon-Entschäumer enthielt. Die Hauptzucht erfolgte bei 30°C unter starker Belüftung. Die Hefe wurde in der spät-logarithmischen Phase, die unter den angegebenen Kulturbedingungen etwa nach 12-15 Stunden erreicht wurde, durch Zentrifugation geerntet und ein- bis zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

Die Ausbeute betrug 90-100 g. Die Hefe wurde bei +4°C aufbewahrt. Der haploide Hefestamm S. cerevisiae 25 a und die daraus isolierte petite-Mutante 25 a-7 EB stammten von T. Bech-Hansen, Department of Biology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. Diese Stämme wurden ebenfalls unter den für S. cerevisiae S288C beschriebenen Bedingungen gezüchtet. Bei der petite-Mutante wurde die spät-logarithmische Phase erst nach 25-28 Stunden erreicht.

3.2 Isolierung von tRNA aus Hefe

Die Isolierung der tRNA aus den haploiden Hefestämmen S. cerevisiae S288C, S. cerevisiae 25 a und der petite Mutante 25 a-7 EB erfolgte ähnlich wie von Monier et al. (138) beschrieben.

50 g Hefe (Feuchtgewicht) wurden in wenig Wasser suspendiert und mit 150 ml wassergesättigtem Phenol versetzt. Nach 6 Stunden Rühren wurden Wasserphase und Phenolphase durch Zentrifugation getrennt. Die wässrige Phase wurde abpipettiert, 2 %-ig an Kaliumacetat gemacht und die RNA durch Zugabe des 3-fachen Volumens Äthanol gefällt. Der Niederschlag wurde dreimal mit je 10 ml 0,01 M Natriumacetat p_H = 5,0 extrahiert und die vereinigten wässrigen Lösungen auf eine DEAE-Säule aufgetragen. Zunächst wurde mit 0,1 M NaCl, dann mit 0,2 M NaCl in 0,01 M Natriumacetat p_H = 5,0 gewaschen, bis im Eluat keine Fällung mit Alkohol mehr auftrat. Die Elution der tRNA erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten: 0,2 - 1,0 M NaCl, 0,01 M NaOAc p_H = 5,0 (je 500 ml). Die tRNA-haltigen Fraktionen wurden zusammengespült und die tRNA mit Äthanol ausgefällt. Aus 50 g Hefe wurden etwa 80-100 mg tRNA isoliert.

3.3 Isolierung von Mitochondrien aus Hefe

Mechanischer Aufschluß der Hefe mit dem Merkenschlager-Desintegrator

Es wurde weitgehend die von Wintersberger (39) beschriebene Methode benutzt. Die Homogenisation der Hefe erfolgte in einem Puffer folgender Zusammensetzung: 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 20 mM TRIS-HCl p_H = 7,4. 10 g (Feuchtgewicht) gewaschene Hefe wurden in 15 ml Homogenisationspuffer suspendiert und etwa 50 g Glasperlen (ø 0,45-0,5 mm) zugegeben, so daß das Schüttelgefäß ungefähr dreiviertel voll war. Nach 15 Sekunden Vorkühlen mit flüssiger Kohlensäure wurde 25-30 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit unter Beibehaltung der Kühlung geschüttelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte in der Kälte bei +4°C. Nach

Abdekantieren der Flüssigkeit wurden die Glasperlen noch dreimal mit je 10 ml Puffer gewaschen, die Überstände vereinigt und mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt; restliche Glasperlen und Zellbruchstücke wurden durch zweimalige Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge, Rotor GSA, 4000 rpm, 10 Minuten, entfernt. Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien in der Sorvall, Rotor SS 34, 10 000 rpm, 20 Min., abzentrifugiert und die Niederschläge zweimal mit dem Homogenisationspuffer gewaschen.

Anwendung von Helicase zur Mitochondrienisolierung

Die Methode wurde weitgehend von Onishi et al. (139) übernommen. 100 g (Feuchtgewicht) frisch geerntete Hefe aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden in 250 ml Sorbitmedium (1,3 M Sorbit, 1 mM EDTA, 10 mM TRIS-Maleinsäure p_H = 5,7) suspendiert und nach Zugabe von 2,1 g Cysteaminhydrochlorid 40 Min. im Wasserbad bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Sorvall, GSA-Rotor, 7000 rpm, 10 Min.) und in 200 ml Sorbitmedium suspendiert. Nach Zugabe von 1,8 g Helicase wurde unter Rühren 45 Min. bei 30°C inkubiert und die Protoplasten anschließend abzentrifugiert (Sorvall, GSA-Rotor, 7000 rpm, 15 Min.) und zweimal mit kaltem Sorbitmedium gewaschen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte in der Kälte bei +4°C. Die gewaschenen Protoplasten wurden in insgesamt 1000 ml Mannitmedium (0,65 M Mannit, 1 mM EDTA, 0,05 % Serumalbumin, 10 mM TRIS-HCl p_H = 6,5) suspendiert. In diesem Medium erfolgte die Lyse der Protoplasten. Dieser Vorgang wurde noch beschleunigt, indem die Suspension 40-45 Sekunden bei mittlerer Umdrehung im Waring Blendor gerührt wurde. Nicht abgebaute Zellen und Zellreste wurden abzentrifugiert (Sorvall, GSA-Rotor, 20 Min. 3500 rpm) und aus dem Überstand die Mitochondrien durch Zentrifugation in der Sorvall, Rotor SS 34, 20 Min. mit 20 000 rpm isoliert. Die Niederschläge wurden zweimal mit kaltem Mannitmedium gewaschen.

Die Glasgefäße und Puffer wurden vor ihrer Benutzung im Autoklaven sterilisiert.

Reinigung der Mitochondrien durch Gradientenzentrifugation

Wenn angegeben, erfolgte die Reinigung der Mitochondrien durch Zentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten (20 % - 70 %). 80 - 150 mg mitochondriales Protein wurden in 1 ml Homogenisationsmedium (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 20 mM TRIS-HCl p_H = 7,4) suspendiert und auf den Gradienten aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte im SW 25-Rotor, der 3 "swing-out"-Becher enthielt, in der Spinco, Modell L, zwei Stunden mit 25 000 rpm. Die rotbraune Mitochondrienbande wurde mit einer Injektionsspritze von oben her entnommen, mit Homogenisationspuffer auf das dreifache Volumen verdünnt und die Mitochondrien durch Zentrifugation (Sorvall, Rotor SS 34, 20 000 rpm, 40 Min.) isoliert.

3.4 Nachweis von Bakterien in mitochondrienhaltigen Niederschlägen

Die abzentrifugierten Mitochondrien wurden in einem Mannit-Puffer suspendiert. Ein Aliquot dieser Suspension wurde mit sterilem Wasser verdünnt und auf einer Agar-Platte (1 % Caseinhydrolysat, 0,5 % NaCl, 1,5 % Agar Agar) ausgestrichen. Nach 48 Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt.

3.5 Inkubation der isolierten Mitochondrien mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Mit Mannitmedium gewaschene Mitochondrien wurden in 5-10 ml 0,65 M Mannit, 0,01 M TRIS-Acetat p_H = 7,8 10 Min. bei 30°C unter Rühren mit 150 Einheiten Schlangengift-Phosphodiesterase inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml kaltem Mannitmedium wurden die Mitochondrien abzentrifugiert (Sorvall, Rotor SS 34, 20 000 rpm, 20 Min) und noch zweimal mit Puffer gewaschen.

3.6 Isolierung von tRNA aus Mitochondrien

Frisch isolierte Mitochondrien (100 - 300 mg Protein) wurden in 5-10 ml 0,01 M

Natriumacetatpuffer p_H = 5,2, der 2 %ig an Natriumdodecylsulfat und 0,1 %ig an Macaloid war, suspendiert und durch kräftiges Rühren homogenisiert. Es folgte die Zugabe von 5-10 ml wassergesättigtem Phenol. Das Gemisch wurde mindestens 2 Stunden kräftig gerührt und die wässrige Phase nach der Abtrennung durch Zentrifugation noch ein zweites Mal mit Phenol extrahiert. Nach Zugabe von etwas festem Kaliumacetat wurde die RNA mit Alkohol in der Kälte gefällt. Eine weitere Reinigung der RNA erfolgte durch Chromatographie des gelösten Niederschlages über eine DEAE-Cellulose-Säule und Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,2 - 1 M NaCl in 0,01 M Natriumacetat p_H = 5,0). Die tRNA wurde mit etwa 0,35 M NaCl eluiert und anschließend mit Alkohol gefällt.

3.7 Isolierung von unfraktionierter Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Mitochondrien

Gewaschene Mitochondrien (100 - 300 mg) aus der haploiden Hefe S288C wurden in 5 ml 0,2 M KH_2PO_4 p_H = 7,5, 0,01 M Mercaptoäthanol suspendiert und 6 mal 20 Sekunden mit je 1 - 2 Min. Pause im Eisbad mit dem Branson-Sonifier beschallt. Die Suspension wurde in der Spinco, Modell L, im Rotor Ti 50, 90 Minuten bei 50 000 rpm und 0°C zentrifugiert und der Überstand im Eisbad unter Rühren mit Ammoniumsulfat bis zu 80 %iger Sättigung versetzt. Der Niederschlag wurde in der Sorvall (Rotor SS 34, 20 000 rpm, 30 Min.) abzentrifugiert, in 0,5 - 1 ml 0,01 M TRIS-HCl p_H = 7,5, 0,1 M KCl, 0,01 M Mercaptoäthanol und 10 % Glycerin gelöst und anschließend gegen einen Puffer derselben Zusammensetzung, der aber 50 %ig an Glycerin war, dialysiert. Die Enzymlösung wurde in der Kälte bei -20°C aufbewahrt und war nur kurz (2-4 Tage) haltbar.

3.8 Quantitative Bestimmung des mitochondrialen Proteins

Die Bestimmung des mitochondrialen Proteins erfolgte nach der von Beisenherz et al. (140) beschriebenen Methode, die jedoch etwas modifiziert wurde. Etwa 2 mg Protein in 0,100 ml Ausgangslösung wurden durch Zugabe von 0,200 ml 6 %iger TCA-Lösung ausgefällt. Nach Zentrifugation des Niederschlages und sorg-

fältigem Entfernen des Überstandes wurde das Protein in 0,500 ml Biuretlösung gelöst, 20 Min. bei Zimmertemperatur geschüttelt und mit 0,500 ml Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Es wurde die Extinktion E_1 bei 546 mμ in einer 1 cm Küvette gemessen. Nach Zugabe einiger KCN-Kristalle wurde erneut die Extinktion E_2 bei 546 mμ gemessen ($E_1 - E_2 = E_{546}$). Der Blindwert wurde folgendermaßen ermittelt: 0,500 ml Biuretlösung und 0,500 ml Wasser wurden in einer 1 cm Küvette gemischt, die Extinktion E'_1 bei 546 mμ und nach Entfärben mit KCN die Extinktion E'_2 bestimmt. $E'_1 - E'_2 = E'_{546}$ stellt den Blindwert dar und wird von E_{546} abgezogen. Der so erhaltene Wert $E^+_{546} = E_{546} - E'_{546}$ wurde mit dem Faktor 38 multipliziert und man erhielt so mg Protein pro ml Ausgangslösung.

Herstellung der Biuretlösung

9 g Seignettesalz wurden in etwa 400 ml 0,2 N NaOH (carbonatfrei) gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 3 g $CuSO_4 x5 H_2O$ und 5,6 g KJ p.a. hinzugefügt. Jedes Salz muß erst gelöst sein, bevor das nächste Salz zugefügt wird. Zuletzt wurde mit 0,2 N NaOH auf 1000 ml aufgefüllt.

3.9 Vorbereitung von Ionenaustauschern

Die DEAE-Cellulose von Serva wurde in 0,5 N Natronlauge eingerührt und dann nach 20 Min. Stehen mit Wasser neutral gewaschen. Anschließend wurde die Cellulose 20 Min. in 1 M NaCl stehengelassen, abgesaugt und drei- bis fünfmal mit dem Startpuffer des jeweiligen Gradienten gewaschen. Zuletzt wurde zweimal in diesem Startpuffer geschlämmt und entgast.

Die DE 23-Cellulose von Whatman wurde zunächst 30 Min. mit 0,5 N HCl behandelt, dann mit Wasser gewaschen bis der Durchlauf $p_H = 4$ hatte und anschließend 30 Min. in 0,5 N NaOH stehengelassen. Die Cellulose wurde dann mit Wasser gewaschen, bis der Durchlauf neutral war. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei der DEAE-Cellulose von Serva.

BD-Cellulose wurde zunächst mehrmals auf der Nutsche mit 1 M NaCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,05 M Natriumacetat p_H = 5,0 und 20 % Äthanol, und anschließend mit dem Startpuffer des jeweiligen Gradienten gewaschen.

DEAE-Sephadex A 25 wurde in einem großen Überschuß des jeweiligen Startpuffers zur Quellung gebracht und in einem Zeitraum von 24 Stunden die überstehende Lösung drei- bis viermal durch frischen Puffer ersetzt.

AG 50 W - X 8 Kationen-Austauscherharz wurde nach kurzem Quellen in Wasser zweimal mit 1 M NaOH und anschließend mit Wasser gewaschen. Dann wurde es drei- bis viermal kurz mit 1 N HCl behandelt und abschließend mit Wasser so lange gewaschen, bis der Durchlauf neutral war. Das Austauscherharz wurde wenige Stunden danach gebraucht. Bei längerer Lagerung (etwa nach 24 Stunden) muß die Waschprozedur wiederholt werden.

3.10 Chromatographie von aminoacylierten tRNAs an benzoylierter DEAE-Cellulose

Benzoylierte DEAE-Cellulose wurde mit einem Puffer folgender Zusammensetzung in eine Säule von 1 x 50 cm eingeschlämmt: 0,05 M Natriumacetat p_H = 5,0, 0,01 M $MgCl_2$ und 0,5 M NaCl. Nachdem die Säule äquilibriert war, wurden 50 - 100 A_{260}-Einheiten aminoacylierte tRNA aufgetragen, wobei beachtet wurde, daß die ^{14}C-cpm und ^{3}H-cpm etwa gleich waren (80 000 - 100 000 cpm). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,5 auf 1,2 M NaCl in 0,05 M Natriumacetat p_H = 5,0, 0,01 M $MgCl_2$, je 750 ml. Die Säule wurde abschließend mit 1,5 M NaCl, 0,05 M Natriumacetat p_H = 5,0, 0,01 M $MgCl_2$ und 20 % Äthanol nachgewaschen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 18-25 ml pro Stunde, und es wurden Fraktionen zu etwa 5 ml aufgefangen. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden von jeder zweiten Fraktion 1,5 ml in 10 ml Bray-Szintillatorgemisch pipettiert und im Szintillationsspektrometer bei diskriminierender Einstellung gemessen.

3.11 Enzymatische Spaltung von Seryl-tRNAs mit T1-RNase und Chromatographie der Hydrolysate an DEAE-Cellulose

90 A_{260}-Einheiten mit ^{3}H-Serin beladene unfraktionierte tRNA (110 000 cpm) aus Mitochondrien und 25 A_{260}-Einheiten mit ^{14}C-Serin beladene unfraktionierte tRNA (160 000 cpm) aus ganzen Zellen des haploiden Hefestammes S288C wurden in 1,2 ml 10 mM Kaliumacetat p_H = 5,2 und 2 mM EDTA mit 1000 Einheiten T1-RNase 2 Stunden bei 37°C gespalten, mit Wasser verdünnt und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (1 x 25 cm), die mit 0,01 M Ammoniumformiat p_H = 5,2 äquilibriert worden war, aufgetragen. Es wurde mit 200 ml 0,01 M Ammoniumformiat p_H = 5,2 gewaschen, dann mit einem linearen Gradienten von 0,01 M auf 0,4 M Ammoniumformiat p_H = 5,2 (je 600 ml) eluiert und abschließend mit 1 M Ammoniumformiat p_H = 5,2 nachgewaschen.
Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 1,5 ml jeder zweiten Fraktion in 10 ml Bray-Szintillatorgemisch pipettiert und bei diskriminierender Einstellung im Szintillationsspektrometer gemessen.

3.12 Oligonucleotidanalyse

Enzymatische Spaltung von tRNA und tRNA-Fragmenten mit T_1-Ribonuclease

8 - 18 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$ oder tRNA-Fragment wurden in 1 ml Wasser mit 250 - 300 Einheiten T1-RNase im Autotitrator bei p_H = 7,5 und 45°C gespalten. Die Aufnahme von Lauge (0,01 M NaOH) wurde automatisch registriert und die Inkubation etwa eine Stunde nach der letzten Zugabe von Lauge beendet. Das Oligonucleotidgemisch wurde nach Zugabe von Harnstoff (ad 7 M, p_H = 7,5) auf die Säule aufgetragen.

Analyse von Oligonucleotiden durch Abbau mit Schlangengift-Phosphodiesterase und Phosphomonoesterase

0,2 - 1,5 A_{260}-Einheiten des jeweiligen Oligonucleotids wurden in 0,1 ml Puffer

(20 mM Ammoniumcarbonat, 1 mM $MgCl_2$) 3 - 4 Stunden bei 37°C mit 0,3 - 0,4 Einheiten Phosphomonoesterase und 5 - 10 Einheiten Schlangengift-Phosphodiesterase inkubiert.

Analyse von Oligonucleotiden durch Abbau mit Milz-Phosphodiesterase

0,5 - 2,0 A_{260}-Einheiten des jeweiligen Oligonucleotids wurden in 0,1 ml Puffer (0,07 M Phosphatpuffer p_H = 6,0) mit 15 - 20 Einheiten Schweinemilz-Phosphodiesterase 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Dephosphorylierung von tRNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von tRNA-Fragmenten erfolgte ähnlich wie beschrieben (141): 100 - 150 A_{260}-Einheiten des tRNA-Fragments wurden mit 0,75 Einheiten Phosphomonoesterase in 1 ml 0,1 M TRIS-HCl (p_H = 8,5) 30 Min. bei 60°C inkubiert und anschließend zweimal phenolisiert und die wässrige Phase mehrere Male ausgeäthert.

Säulenchromatographie von Oligonucleotiden

Nach der Totalspaltung mit T1-RNase wurde das Oligonucleotidgemisch durch Chromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule (0,3 x 70 cm) fraktioniert. Die Säule wurde mit Druck (1 - 1,5 Atü) gestopft und vor Auftragen des Oligonucleotidgemisches mit etwa 100 ml Startpuffer gewaschen. Nach Auftragen der Probe wurde ebenfalls ausführlich (100 - 150 ml) mit Startpuffer nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten: 0,01 - 0,3 M NaCl, 0,01 M TRIS-HCl p_H = 7,3, 7 M Harnstoff (je 250 ml). Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt, indem 0,1 ml entnommen, mit 5 ml Bray-Szintillator versetzt und im Szintillationsspektrometer gemessen wurden.

Isolierung der Oligonucleotide aus Harnstoffpuffer

Zur Isolierung geringer Nucleotidmengen aus Harnstoff- und Salzlösungen wurde eine bekannte Vorschrift (142) modifiziert. Zum Ausfällen der Oligonucleotide wurde 1 ml des Säuleneluats mit 10 µl 1,1 M Zinkacetatlösung versetzt und mit 0,5 M NaOH auf p_H = 8,1 eingestellt. Der p_H -Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt. Nach etwa 10 - 20 Min. wurde der gallertartige Niederschlag abzentrifugiert und zweimal mit 3 - 5 ml 2 mM $NaHCO_3$-Lösung p_H = 8,1 gewaschen, um restlichen Harnstoff zu entfernen. Der Niederschlag wurde in möglichst wenig 1 M Ammoniumcarbonat p_H = 8,5 aufgelöst. Die Kationen wurden durch Zugabe eines Kationenaustauschers entfernt. Aus einer frisch gewaschenen AG 50W-X8-Suspension wurde soviel Austauscherharz zugegeben (CO_2-Entwicklung) bis p_H = 5 - 5,5 erreicht war. Unter gelegentlichem Umrühren wurde die Suspension 20 - 30 Min. stehengelassen und dann über Glasfaserfilter abgesaugt. Die klare Lösung wurde eingeengt.

Papierelektrophorese und Chromatographie

Papierelektrophoresen wurden bei p_H = 2,7 oder p_H = 3,5 durchgeführt. Die Puffer enthielten: 25 ml konz. Ameisensäure, 5 ml 0,1 M EDTA, 3 l Wasser, mit Ammoniak auf p_H 2,7 eingestellt, bzw. 15 ml konz. Ameisensäure, 8 ml 0,1 M EDTA, 5 l Wasser, mit Ammoniak auf p_H = 3,5 eingestellt. Die Elektrophorese erfolgte 2 Stunden bei 3000 Volt. Papier- und Dünnschichtchromatographie wurde in folgenden Systemen durchgeführt:
System A: Propan (2)-ol/HCl/Wasser (65 : 16,7 : 18,3),
System B: $(NH_4)_2SO_4$-gesättigte Lösung/1M NaoAc/Propan (2)-ol (40 : 9 : 1).

3.13 Reduktion von tRNA-Fragmenten mit Natriumborhydrid

Die tRNA-Fragmente Phe 1 - 15 und Phe 17-73 wurden nach einer bekannten Vorschrift (104) mit ^3H-Natriumborhydrid reduziert. Nach Beendigung der Reduktion wurde die verdünnte Lösung jeweils über eine kleine DEAE-Cellulose-Säule (1 x 3 cm)

chromatographiert und das tRNA-Fragment mit einem linearen NaCl-Gradienten von der Säule eluiert: 0,05 - 1,0 M NaCl, 0,02 M Natriumacetat p_H = 7,0 (je 100 ml). Fraktionen, die das Fragment enthielten, wurden gegen Wasser dialysiert, eingeengt und mit Äthanol gefällt.

3.14 Entfernen von Nucleasen aus einem Reaktionsgemisch

Pankreas-RNase wurde durch Adsorption an Macaloid (143) aus einer Lösung entfernt. Zu diesem Zweck wurde eine Suspension von Macaloid in 0,01 M TRIS-HCl p_H = 7,3 (5 mg/ml) hergestellt, auf 70° - 80°C erhitzt und 40 - 60 Sekunden mit einem Branson-Sonifier beschallt. 0,65 ml dieser Suspension wurden zu 6,5 ml eines Inkubationsgemisches gegeben, in dem 650 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$(HCl) mit 130 µg Pankreas-RNase gespalten wurden. Nach mehrmaligem Schütteln und kurzem Stehenlassen wurde das Macaloid abzentrifugiert und der Überstand noch zweimal in der gleichen Weise behandelt. Kleine Reaktionsansätze wie z. B. bei analytischen Gelen, wurden ebenfalls mit Macaloid behandelt. Alle anderen RNasen wurden durch Phenolisieren entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde drei- bis viermal mit der gleichen Menge wassergesättigtem Phenol versetzt, die vereinigten Phenolphasen wurden noch zweimal mit Wasser extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen mehrmals mit Äther extrahiert.

3.15 Isolierung von tRNA und tRNA-Fragmenten aus Säuleneluaten

Säulenfraktionen, die tRNA oder tRNA-Fragmente enthielten, wurden nach dem Zusammenspülen 24-36 Stunden im Kälteraum dialysiert, um Harnstoff und Salze zu entfernen. Das Wasser wurde mehrere Male gewechselt. Häufig hatte der Harnstoffpuffer einen p_H-Wert von 3; in solchen Fällen wurde zunächst gegen 0,05 M TRIS-HCl p_H = 7,5 dialysiert. Die salzfreien Lösungen wurden am Rotationsverdampfer eingeengt, etwa 2 %ig an Kaliumacetat gemacht und die RNA durch Zugabe von Äthanol gefällt. In einigen Fällen, wenn mehr als 2 A_{260}-Einheiten tRNA oder Fragment pro ml enthalten waren, erfolgte die Alkoholfällung direkt aus der Lösung. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand nochmals

über Membranfilter abgesaugt. Die ausgefällte tRNA wurde mehrmals mit Äthanol gewaschen und in einigen Fällen nach dem Lösen dialysiert, um die letzten Spuren von Harnstoff zu entfernen. Die Fragmente wurden im allgemeinen als Alkoholniederschlag aufbewahrt.

3.16 Bestimmung der Akzeptoraktivität von unfraktionierter tRNA

Die Akzeptoraktivität von unfraktionierter tRNA aus Hefe, Mitochondrien und E. coli wurde - wenn nicht anders angegeben - nach folgender Methode bestimmt: 0,1 ml des Standardinkubationsgemisches enthielten 0,3 - 0,5 A_{260}-Einheiten tRNA, 0,01 ml ^{14}C-DL-Aminosäure (1 µM/ml) 0,01 ml ATP-Gemisch (0,1 M ATP, 0,2 M $MgCl_2$, 0,25 M TRIS-HCl p_H = 7,5) und 5-10 µ Einheiten unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Brauereihefe, der haploiden Hefe S288C oder E. coli. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. bei 37°C wurde mit 5 %iger Trichloressigsäure gefällt, auf Glasfaserfilter abgesaugt, mit Trichloressigsäure und abschließend mit Äthanol gewaschen und bei 80°C getrocknet. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in 5 ml Toluol-Szintillator. Wenn angegeben, enthielten 0,1 ml des Standardinkubationsgemisches 0,010 ml CTP (1 µMol/ml).
Bei der mitochondrialen Aminoacyl-tRNA-Synthetase wurden keine Enzymeinheiten bestimmt. In einem Versuch wurde die Abhängigkeit der Beladung von der Enzymmenge untersucht und so die optimale Menge an mitochondrialem Enzym bestimmt.

3.17 Bestimmung der Akzeptoraktivität von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ und tRNA-Fragmenten

Wenn nicht anders beschrieben, wurden folgende Standardinkubationsbedingungen bei der Beladung von $tRNA^{Phe}$ und den Fragmenten verwendet: 0,04 - 0,1 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$ oder eines Fragmentgemisches wurden 90 Min. bei 37°C in 0,03 - 0,07 ml Wasser mit 5 µl 100 mM TRIS-Acetat p_H = 7,5, 40 mM $MgCl_2$ vorinkubiert. Nach Zugabe von 5 nMol ^{14}C-Phe, 1 µMol ATP, 2,0 µMol $MgCl_2$, 2,5 µMol TRIS-HCl p_H = 7,5, 0,025 µMol CTP, 0,01 A_{280}-Einheiten Aldolase,

20 - 30 µ Einheiten CCA-Transferase und 80 - 100 µ Einheiten Phenylalanyl-tRNA-Synthetase in 0,07 - 0,03 ml (Gesamtvolumen 0,100 ml) wurde 40 Min. bei 20°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von etwa 5 ml kalter 5 %iger Trichloressigsäure gestoppt, die Lösung über Glasfaserfilter abgesaugt und anschließend noch zwei- bis dreimal mit etwa der gleichen Menge Trichloressigsäure und einmal mit wenig kaltem Äthanol gewaschen. Die Filter wurden bei 80°C im Trockenofen getrocknet und nach Zugabe von 5 ml Toluol-Szintillator im Szintillationsspektrometer gezählt.

Bei den Versuchen zur Fehlbeladung von Fragmentkombinationen wurden ebenfalls die beschriebenen Inkubationsbedingungen benutzt. An Stelle der angereicherten Phenylalanyl-tRNA-Synthetase wurde jedoch eine unfraktionierte Proteinfraktion aus Hefe benutzt, die brauchbare Aktivität für die Beladung mit folgenden Aminosäuren hatte: Lys, Val, Glu, Asp, Pro, Ala, Leu, Met, Cys, Tyr, His, Thr, AsN, Arg und Gly. Die genannten Aminosäuren wurden bei der Aminoacylierung in Gruppen von vier bzw. drei eingesetzt. Im Falle einer positiven Reaktion wurden dann die einzelnen Aminosäuren getestet. Bei der heterologen Fehlbeladung wurde eine unfraktionierte E. coli-Synthetase eingesetzt.

3.18 Beladung von unfraktionierter tRNA mit radioaktivem Serin in präparativen Mengen

Das Inkubationsgemisch für die präparative Darstellung von Seryl-tRNA enthielt in 0,8 ml 25-30 A_{260}-Einheiten unfraktionierte tRNA, 0,1 ml ATP-Gemisch (0,1 M ATP, 0,2 M $MgCl_2$, 0,25 M TRIS-HCl p_H = 7,5), 0,1 ml radioaktive Aminosäure (L-Serin, ^{14}C-markiert 160 C/M, 0,5 µMol/ml oder DL-Serin, ^{3}H-markiert, 157 C/M, 1 µMol/ml) und 50-100 µEinheiten unfraktionierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Es wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde bis zur Trübung Essigsäure zugegeben und mit 0,8 ml Phenol 30 Min. geschüttelt. Phenolphase und Wasserphase wurden durch Zentrifugation getrennt, die Wasserphase zweimal mit Äther extrahiert und anschließend die aminoacylierte tRNA

mit 2 N Salzsäure gefällt und noch zweimal mit 0,1 N Salzsäure gewaschen. Der Niederschlag wurde in 0,05 M Natriumacetatpuffer p_H = 5,0 gelöst. In einigen Fällen wurde das Inkubationsgemisch nach Beendigung der Reaktion auf eine Sephadex G 25-Säule (1 x 30 cm) aufgetragen und mit 0,01 M KH_2PO_4-Puffer p_H = 4,8 eluiert. Die beladene tRNA wurde so von freier Aminosäure und ATP getrennt.

3.19 Disk-Elektrophorese

Die Anwendung der Diskelektrophorese zur Auftrennung von tRNA-Fragmenten wurde von P. Philippsen in unserem Labor ausgearbeitet und beschrieben (100). Es wurde das Diäthylbarbitursäure/TRIS-HCl-System von Richards et al. benutzt (144), das Sammelgel enthielt jedoch 16 % Acrylamid und 1,3 % Bisacrylamid und das Trenngel 5 % Cyanogum 41 (eine Mischung aus einer Volumeneinheit 95 %iger Acrylamidlösung und 20 Volumeneinheiten 5 %iger Bisacrylamidlösung). Die Elektrophorese erfolgte bei 15°C (Kühlung mit Leitungswasser) und dauerte etwa 6-7 Stunden bei 300 - 400 Volt und 100 mAmp. Die Auftrennung der tRNA-Fragmente im präparativen Maßstab erfolgte in 0,5 - 1 cm dicken Gelplatten, die 11 % Acrylamid und 0,5 % Bisacrylamid enthielten.

Für Untersuchungen unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde von R. Thiebe folgendes System ausgearbeitet: In einem Liter einer 5 mM Diäthylbarbitursäurelösung wurden 3,3 mMol Magnesiumpulver gelöst (p_H = 7,3). Das Trenngel enthielt 12 % Acrylamid, 0,35 % Bisacrylamid, 4,5 mM $MgCl_2$, 65 mM Imidazol (mit HCl auf p_H = 7,8 eingestellt), 4 mM Tetramethyläthylendiamin und 3 mM Ammoniumpersulfat. Das Sammelgel enthielt 5 % Acrylamid, 0,25 % Bisacrylamid, 4,5 mM $MgCl_2$, 40 mM Imidazol (mit HCl auf p_H = 5,8 eingestellt); Tetramethyläthylendiamin und Ammoniumpersulfat waren wie beim Trenngel. Die Laufzeit des Gels betrug etwa drei Stunden bei 4°C und 250 Volt.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit dem gleichen Volumen einer Lösung versetzt, die 50 % Saccharose, etwas Bromphenolblau (als Referenz) und (aber

nur unter dissoziierenden Bedingungen) 7 M Harnstoff enthielt. Bei den analytischen Gelen wurden die Polynucleotide mit "Stains-all" (136) und bei den präparativen Gelen mit Toluidinblau 0 angefärbt. Die Densitogramme der Gele wurden bei 546 nm mit einem umgebauten Photometer PL 4 der Fa. Zeiss, Oberkochen, aufgenommen. Die Elution der tRNA-Fragmente aus einem präparativen Gel erfolgte mit einem Phenol-Wasser-Gemisch, die weitere Reinigung geschah durch Chromatographie über eine DEAE-Harnstoff-Säule.

Aus den Densitogrammen wurden die R_B-Werte der auftretenden Oligonucleotide bestimmt. Unter R_B-Wert versteht man den Quotienten aus der Laufstrecke eines Oligonucleotids dividiert durch die Laufstrecke von Bromphenolblau. In Tabelle 7 sind die R_B-Werte einiger tRNA-Fragmente angegeben. Trägt man die R_B-Werte von Oligonucleotiden bekannter Kettenlänge gegen den Logarithmus ihrer Nucleotidzahl auf, so erhält man eine Gerade, aus der man die Kettenlänge nicht analysierter Fragmente mit einer Genauigkeit von etwa 95 % abschätzen kann (100).

Tabelle 7: Beweglichkeit von $tRNA^{Phe}$(HCl) und einigen Fragmenten bei der Disk-Elektrophorese in einem 16 %igen Polyacrylamidgel. Die R_B-Werte sind von Gel zu Gel etwas verschieden, jedoch relativ zu einem anderen Fragment ziemlich konstant.

	R_B-Wert
$tRNA^{Phe}$(HCl)	0,11
Phe 21-76	0,20
Phe 17-73	0,21
Phe 34-74	0,28
Phe 1-36	0,29
Phe 38-76	0,31
Phe 1-33	0,33
Phe 38-65/66	0,40
Phe 48-76	0,44
Phe 1-27	0,45
Phe 1-18	0,59
Phe 1-15	0,63

V. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit werden Untersuchungen über serinspezifische tRNAs aus Hefe-Mitochondrien beschrieben. Unter Anwendung einer mechanischen und einer enzymatischen Methode wurden Hefezellen aufgeschlossen und Mitochondrien isoliert. Elektronenmikroskopaufnahmen zeigten, daß mit der letztgenannten Methode sehr saubere und unbeschädigte Mitochondrien erhalten wurden, aus denen tRNA und ein Synthetasepräparat isoliert werden konnten. Das mitochondriale Synthetasepräparat konnte mitochondriale tRNA besser mit Serin und Leucin beladen als Synthetase aus ganzen Zellen. Die mit radioaktivem Serin beladenen tRNAs aus Mitochondrien und ganzen Zellen wurden durch Chromatographie an BD-Cellulose verglichen. Bei der Mehrzahl der Versuche wurden im Elutionsprofil der mitochondrialen tRNA zusätzliche Radioaktivitätsgipfel beobachtet. Die genannten Ergebnisse können als Hinweis darauf gewertet werden, daß Hefe-Mitochondrien eigene serinspezifische tRNAs besitzen. Weitere Versuche zur Charakterisierung der mitochondrialen $tRNA^{Ser}$-Spezies ergaben, daß sie sich in der Nucleotidsequenz am 3'-Ende nicht von denen aus ganzen Zellen unterscheiden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden Untersuchungen über die Synthetaseerkennungsregion von $tRNA^{Phe}_{Hefe}$ beschrieben. Durch enzymatische Partialspaltung von $tRNA^{Phe}$ wurden Fragmente erhalten, die durch Säulenchromatographie oder präparative Disk-Elektrophorese gereinigt und anschließend durch Totalspaltung mit T1-RNase analysiert werden konnten. Pankreas-RNase spaltet unter den verwendeten Bedingungen nur neben dem Anticodon und am 3'-Ende, während T2-RNase zusätzlich noch in der hU-Schleife spaltet. Größere Fragmente, die durch Spaltung mit Endonucleasen erhalten werden, konnten unter geeigneten Bedingungen mit Schlangengift- oder Milz-Phosphodiesterase zu kürzeren Fragmenten abgebaut werden.

Nachdem zunächst die optimalen Aminoacylierungsbedingungen ermittelt worden waren, wurde die Akzeptoraktivität der Fragmente bestimmt. Es zeigte sich, daß Fragmentkombinationen langsamer und in einem geringeren Ausmaß aminoacyliert

wurden als intakte $tRNA^{Phe}$, jedoch blieb die Spezifität für Phenylalanin erhalten. Keines der Fragmente ließ sich aminoacylieren, wenn es allein getestet wurde. Die niedrige Akzeptoraktivität mancher Fragmentkombinationen beruht vermutlich darauf, daß bei der Komplexbildung neben aktiven auch inaktive Aggregate entstehen. Mit Hilfe der Disk-Elektrophorese unter nicht-dissoziierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, daß sich außer bei den beladbaren auch bei den nichtbeladbaren Kombinationen die komplementären Fragmente zu einem Komplex zusammenlagern.

Die Versuche tragen zur Einengung der Synthetaseerkennungsregion bei. Fragmentkombinationen, bei denen die Anticodonregion (Schleife und Stamm) oder fünf Nucleotide aus der hU-Schleife fehlen, konnten noch aminoacyliert werden. Die spezifische Erkennungsregion für Phenylalanyl-tRNA-Synthetase kann also nicht in der Anticodonregion oder der hU-Schleife liegen, sondern muß in anderen Bereichen der $tRNA^{Phe}$ lokalisiert sein.

LITERATURVERZEICHNIS

1. The Genetic Code, 31. Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. (1966)

2. P. Lengyel und D. Söll — Bacteriological Reviews 33, 264 (1969)

3. F. Lipmann — Science 164, 1024 (1969)

4. F.H.C. Crick: — A note for the RNA tie club, abgedruckt bei M. B. Hoagland in E. Chargaff und J. N. Davidson: The Nucleic Acids, Academic Press, New York 1960, Bd. III, S. 400

5. M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik und M. L. Stephenson — Biochim. Biophys. Acta 24, 215 (1957)

6. K. Ogata und H. Nohara — Biochim. Biophys. Acta 25, 659 (1957)

7. H. G. Zachau, — Angewandte Chemie 81, 645 (1969)

8. R. B. Loftfield, L. I. Hecht und E. A. Eigner — Biochim. Biophys. Acta 72, 383 (1963)

9. F. Chapeville, F. Lipmann, G. von Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray jr. und S. Benzer — Proc. Natl. Acad., Sci. U.S. 48, 1086 (1962)

10. M. Yarus — Ann. Rev. Biochemistry 38, 841 (1969)

11. R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison M. Marquissee, S. E. Merrill, J. R. Penswick und A. Zamir — Science 147, 1462 (1965)

12. F. Cramer, H. Doepner, F. von der Haar, E. Schlimme und H. Seidel — Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61, 1384 (1968)

13. M. Levitt — Nature 224, 759 (1969)

14. P. G. Connors, M. Labanauskas und W. W. Beeman — Science 166, 1528 (1969)

15. W. Fuller, S. Arnott und J. Creek — Biochem. J. 114, 26 P (1969)

16. J. Ninio, A. Favre und M. Yaniv — Nature 223, 1333 (1969)

17. G. Melcher, — FEBS-Letters 3, 185 (1969)

18. F. Cramer in — Progress in Nucleic Acid Research, Academic Press, Vol. 11, 391 (1971)

19. S. Arnott in — Progress in Biophysics and Molecular Biology, Pergamon Press, Vol 22, 181 (1971)

20. R. Chambers in — Progress in Nucleic Acid Research, Academic Press, Vol. 11, 489 (1971)

21. L. H. Schulman und R. W. Chambers — Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61, 308 (1968)

22. B. Dudock, C. Di Peri, K. Scileppi und R. Reszelbach — Proc. Natl. Acad, Sci. U.S. 68, 681 (1971)

23. W. K. Yang und G. D. Novelli	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 59, 208 (1968)
24. F. H. C. Crick,	J. Mol. Biol. 19, 548 (1966)
25. M. L. Gefter und R. L. Russel	J. Mol. Biol. 39, 145 (1969)
26. H. M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner und J. D. Smith	Nature 217, 1019 (1968)
27. D. Hirsh	Nature 228, 57 (1970)
28. W. E. Barnett und D. H. Brown	Proc. Natl. Acad, Sci. U.S. 57, 452 (1967)
29. M. Rabinowitz und H. Swift	Physiological Review 50, 376 (1970)
30. G. Burkard, P. Guillemaut und J. H. Weil	Biochim. Biophys. Acta 224, 184 (1970)
31. T. S. Stewart, R. J. Roberts und J. L. Strominger	Nature 230, 36 (1971)
32. R. W. Gould, M. P. Thornton, V. Liepkalns und W. J. Lennarz	J. Biol. Chem. 243, 3096 (1968)
33. K. B. Jacobson	Nature New Biology 231, 17 (1971)

34. J. Ilan	Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 787 (1969)
35. W. E. Barnett, D. H. Brown und J. L. Epler	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 1775 (1967)
36. D. H. Brown und G. D. Novelli	Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 262 (1968)
37. J. L. Epler und W. E. Barnett	Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 328 (1967)
38. J. L. Epler	Biochemistry 8, 2285 (1969)
39. E. Wintersberger	Biochem. Z. 341, 399 (1965)
40. D. J. South und H. R. Mahler	Nature 218, 1226 (1968)
41. S. A. Leon und H. R. Mahler	Arch. Biochem. Biophys. 126, 305 (1968)
42. B. Accoceberry und A. Stahl	Bull. Soc. Chim. Biol. 52, 113 (1970)
43. B. Accoceberry und	Biophys. Res. Commun. 42, 1235 (1971)
44. J. Casey, H. Fukuhara, G. S. Getz und M. Rabinowitz	J. Cell. Biol. 43, 13 A (1969)
45. Y. Suyama und J. Eyer	Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 746 (1967)
46. C. A. Buck und M. M. K. Nass	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 60, 1045 (1968)

47.	C. A. Buck und M. M. K. Nass	J. Mol. Biol. 41, 67 (1969)
48.	P. S. Lietman	J. Biol. Chem. 243, 2837 (1967)
49.	E. Knight und T. Sugiyama	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 63, 1383 (1969)
50.	A. E. Smith und K. A. Marcker	J. Mol. Biol. 38, 241 (1968)
51.	J. B. Galper und J. E. Darnell	Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 205 (1969)
52.	F. Sala und H. Küntzel	Europ. J. Biochem. 15, 280 (1970)
53.	M. M. K. Nass und C. A. Buck	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 62, 506 (1969)
54.	M. M. K. Nass und C. A. Buck	J. Mol. Biol. 54, 187 (1970)
55.	M. Cohen und M. Rabinowitz	J. Cell. Ciol. 47, 37a (1970)
56.	A. Halbreich und M. Rabinowitz	Proc. Natl. Acad, Sci. U. S. 68, 294 (1971)
57.	J. C. Mounolou, H. Jakob und P. P. Slonimski	Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 218 (1966)
58.	E. Reich und D. J. L. Luck	Proc. Natl. Acad, Sci. U. S. 55, 1600 (1966)
59.	E. Moustachi und D. H. Williamson	Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 56 (1966)

60. G. Corneo, C. Moore, R. Sanadi, L. I. Grossman und J. Marmur — Science 151, 687 (1966)

61. E. Goldring, L. I. Grossman, D. Krupnick, D. Cyrer und J. Marmur — J. Mol. Biol. 52, 323 (1970)

62. P. Nagley und A. W. Linnane — Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 989 (1970)

63. G. R. Fink — Methods in Enzymology 17, 59 (1970)

64. D. W. Gregory, E. S. Polakis und W. Bartley — Methods in Enzymology 12, Teil A, 469 (1967)

65. A. A. Eddy, D. H. Williamson — Nature 179, 1252 (1957)

66. B. P. Doctor, J. E. Loebel und D. A. Kellog — Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 31, 543 (1966)

67. D. Richter und F. Lipmann — Biochemistry 9, 5065 (1970)

68. R. Thiebe und H. G. Zachau — Biochim. Biophys. Acta 217, 294 (1970)

69. C. J. Smith, P. M. Smith und E. Herbert — Biochemistry 5, 1323 (1966)

70. T. Ishida und K. Miura — J. Mol. Biol. 11, 341 (1965)

71. H. G. Zachau, D. Dütting und H. Feldmann — Z. Physiol. Chem. 347, 212 (1966)

72. I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. C. Tigerstrom, E. Wimmer und G. H. Tener, Biochemistry 6, 3043 (1967)

73. S. Nishimura und G. D. Novelli, Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 161 (1963)

74. S. Nishimura und G. D. Novelli, Proc. Natl. Acad, Sci. U.S. 53, 178 (1965)

75. J. R. Penswick, Doktorarbeit, Cornell University, Ithaka, New York, 1966

76. A. A. Bayev, I. Fodor, A. D. Mirzabekov, V. D. Axelrod und L. Ya. Kazarinova, Molekulyarnaya Biologiya 1, 859 (1967)

77. P. Philippsen, R. Thiebe, W. Wintermeyer und H. G. Zachau, Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 922 (1968)

78. W. Wintermeyer und H. G. Zachau, FEBS-Letters 11, 160 (1970)

79. B. Beltchev und M. Grunberg-Manago, FEBS-Letters 12, 24 (1970)

80. A. D. Mirzabekov, L. Ya. Kazarinova, D. Lastity und A. A. Bayev, FEBS-Letters 3, 268 (1969)

81. A. D. Mirzabekov, D. Lastity und A. A. Bayev, FEBS-Letters 4, 281 (1969)

82. A. D. Mirzabekov, E. S. Levina und A. A. Bayev — FEBS-Letters 5, 218 (1969)

83. I. I. Chuguev, V. D. Axelrod und A. A. Bayev — Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 348 (1969)

84. I. I. Chuguev, V. D. Axelrod und A. A. Bayev — Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 108 (1970)

85. A. D. Mirzabekov, D. Lastity, E. S. Levina und A. A. Bayev — Nature New Biology 229, 21 (1971)

86. S. Hashimoto, M. Kawata und S. Takemura — Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 777 (1969)

87. K. Oda, F. Kimura, F. Harada und S. Nishimura — Biochim. Biophys. Acta 179, 97 (1969)

88. T. Seno, M. Kobayashi und S. Nishimura — Biochim. Biophys. Acta 190, 285 (1969)

89. T. Seno, I. Kobayashi, M. Fukuhara und S. Nishimura — FEBS-Letters 7, 343 (1970)

90. T. Seno und S. Nishimura — Biochim. Biophys. Acta 228, 141 (1971)

91. T. Seno, K. Sano und T. Katsura — FEBS-Letters 12, 137 (1971)

92. N. Imura, H. Schwam und R. W. Chambers — Proc. Natl. Acad, Sci. U.S. 62, 1203 (1969)

93. N. Imura, G. B. Weiss und R. W. Chambers — Nature 222, 1146 (1969)

94. J. Schmidt und B. R. Reid — Biochim. Biophys. Acta 213, 539 (1970)

95. J. Schmidt, B. Burchardt und B. R. Reid — J. Biol. Chem. 245, 5743 (1970)

96. R. Thiebe und H. G. Zachau — Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 1024 (1969)

97. P. Philippsen und H. G. Zachau — FEBS-Letters 15, 69 (1971)

98. U. L. RajBhandary, S. H. Chang, A. Stuart, R. D. Faulkner, R. M. Hoskinson und H. G. Khorana — Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 751 (1967)

99. W. Wintermeyer und H. G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung

100. P. Philippsen — Doktorarbeit, München 1971

101. S. H. Chang und U. L. RajBhandary — J. Biol. Chem. 243, 592 (1968)

102. T. Uchida und F. Egami — J. Biochem. (Tokyo) 61, 44 (1967)

103. M. Petrova, P. Philippsen und H. G. Zachau — Manuskript in Vorbereitung

104. T. Igo-Kemenes und H. G. Zachau — Europ. J. Biochem. 10, 549 (1969)

105. U. L. RajBhandary, A. Stuart und S. H. Chang — J. Biol. Chem. 243, 584 (1968)

106. R. Rigler, E. Cronvall, R. Hirsch, U. Pachmann und H. G. Zachau — FEBS-Letters 11, 320 (1970)

107. F. J. Kull, P. O. Ritter und K. B. Jacobson — Biochemistry 8, 3015 (1969)

108. R. Taglang, J. Waller, N. Befort und F. Fasiolo — Europ. J. Biochem. 12, 550 (1970)

109. H. G. Zachau — Europ. J. Biochem. 5, 559 (1968)

110. J. S. Loehr und E. B. Keller — Proc. Natl. Acad. Sci 61, 1115 (1968)

111. K. Harbers, R. Thiebe und H. G. Zachau — Manuskript in Vorbereitung

112. J. C. Pinder und W. B. Gratzer — Biochemistry 9, 4519 (1970)

113. A. D. Mirzabekov, D. Lastity, E. S. Levina und A. A. Bayev — FEBS-Letters 7, 95 (1970)

114. T. Lindahl, A. Adams und J. R. Fresco — Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 941 (1966)

115. W. J. Gartland und N. Sueoka — Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 948 (1966)

116. F. Fittler und H. G. Zachau — unveröffentlicht

117. F. Fittler und R. H. Hall — Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 441 (1966)

118. M. Yoshida, Y. Kaziro und T. Ukita — Biochim. Biophys. Acta 166, 646 (1968)

119. J. Carbon und J. B. Curry — J. Mol. Biol. 38, 201 (1968)

120. G. Sundharadas, J. R. Katze, D. Söll, W. Konigsberg und P. Lengyel — Proc. Natl. Acad, Sci. U.S. 61, 693 (1968)

121. M. Yaniv und B. G. Barrell — Nature, im Druck

122. Squires und J. Carbon — Nature, im Druck

123. S. K. Dube, K. A. Marcker und A. Yudelevich — FEBS-Letters 9, 168 (1970)

124. D. Dütting, H. Feldmann und H. G. Zachau — Z. Physiol. Chemie 347, 249 (1966)

125. D. H. L. Bishop, J. R. Claybrock und S. Spiegelmann — J. Mol. Biol. 26, 373 (1967)

126. R. Giege, D. Kern, J. P. Ebel und R. Taglang — FEBS-Letters, im Druck

127. H. G. Zachau — Nova Acta Leopoldina, im Druck

128. R. Thiebe und H. G. Zachau — Europ. J. Biochem. 5, 546 (1968)

129. R. Thiebe und H. G. Zachau — Methods in Enzymology 20, 179 (1971)

130. H. Overath, F. Fittler, K. Harbers, R. Thiebe und H. G. Zachau — FEBS-Letters 11, 289 (1970)

131. M. Kunitz — J. Gen. Physiol. 24, 15 (1940)

132. H. Feldmann, D. Dütting und H. G. Zachau — Z. Physiol. Chem. 347, 236 (1966)

133. W. E. Razzell — Methods in Enzymology 6, 236 (1963)

134. A. Bernardi und G. Bernardi — Biochim. Biophys. Acta 155, 360 (1968)

135. D. Dütting und H. G. Zachau — Biochim, Biophys. Acta 91, 573 (1964)

136. A. E. Dahlberg, C. W. Dingman und A. C. Peacock — J. Mol. Biol. 41, 139 (1969)

137. C. A. Bray — Anal. Biochem. 1, 279 (1960)

138. R. Monier, M. L. Stephenson und F. C. Zamecnik — Biochim. Biophys. Acta 43, 1 (1960)

139. T. Onishi, K. Kawaguchi und B. Hagihara — J. Biol. Chem. 241, 1797 (1966)

140. G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfleiderer — Z. Naturforschung 8b, 555 (1953)

141. D. R. Harkness und R. J. Hilmoe — Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 393 (1962)

142. K. Danek, G. Weimann und F. Cramer — Experientia 21, 417 (1965)

143. W. M. Stanley und R. M. Bock — Biochemistry, 4, 1302 (1965)

144. E. G. Richards, J. A. Coll und W. B. Gratzer — Anal. Biochem. 12, 452 (1952)

145. R. Thiebe, K. Harbers und H. G. Zachau — Manuskript in Vorbereitung

146. K. Nakanishi, N. Furutachi, M. Funamizu, D. Grunberger und I. B. Weinstein — J. Am. Chem. Soc. 92, 7617 (1970)

LEBENSLAUF

Am 10. März 1940 wurde ich als Sohn des Landwirts Friedrich Bernhard Harbers und seiner Ehefrau Magda, geb. Möhlenbrock in Delmenhorst geboren. Im Frühjahr 1946 übersiedelten meine Eltern nach Seeverns, Kreis Wesermarsch, wo ich im selben Jahr eingeschult wurde. Von 1951 bis 1957 besuchte ich das Gymnasium in Tossens und anschließend das Gymnasium in Nordenham, wo ich im Frühjahr 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Sommersemester 1960 bis 1963 studierte ich Zoologie und anschließend Chemie an der Universität München. Im Sommer 1965 bestand ich das Vordiplom- und im Dezember 1967 das Hauptdiplomexamen. Die Diplomarbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München unter Anleitung von Prof. H. G. Zachau durchgeführt.

Die vorliegende Doktorarbeit entstand in der Zeit von Februar 1969 bis September 1971 unter der Anleitung von Prof. H. G. Zachau im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie.